

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

**DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE BIOMEDICHE**

Ciclo XXVIII

**06/F4 - Malattie dell'apparato locomotore e medicina fisica e riabilitativa  
MED/33 - Malattie dell'apparato locomotore**

Il ruolo del microambiente extracellulare nella modulazione  
della staminalità e del differenziamento di cellule staminali  
mesenchimali (MSC)

**Presentata da: Dr.ssa Annamaria Massa**

**Coordinatore Dottorato  
Chiar.mo Prof.  
Lucio Ildebrando Cocco**

**Tutor  
Chiar.mo Prof.  
Nicola Baldini**

**Correlatori**

**Dr.ssa Donatella Granchi**

**Dr.ssa Francesca Perut**

**Esame finale anno 2016**



## INDICE

INDICE .....	2
CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI .....	4
Caratteristiche delle MSC.....	5
Proprietà immunoregatorie delle MSC.....	6
Homing delle MSC.....	7
La multipotenza e il differenziamento delle MSC.....	9
Fonti di MSC.....	12
Midollo osseo.....	12
Tessuto adiposo.....	14
Polpa dentale.....	17
POTENZIALE TERAPEUTICO DELLE MSC.....	19
Applicazione delle MSC nella riparazione del tessuto osseo.....	21
Il tessuto osseo.....	22
Il processo di guarigione ossea.....	23
Infiammazione.....	24
Riparazione.....	25
Rimodellamento.....	26
Eventi molecolari della riparazione ossea.....	28
Via del segnale di Wnt.....	30
Via del segnale di TGF $\beta$ .....	30
Via del segnale di FGF.....	31
Via del segnale di Notch.....	31
Via del segnale di MAPK.....	32
Fattori di trascrizione (TF).....	32
Ruolo dei fattori di crescita.....	33
Ruolo del microambiente extracellulare.....	36
Tensione di ossigeno.....	36
Il pH extracellulare.....	38
Limiti della terapia cellulare in ortopedia.....	41
EFFETTO DELL'IP OSSIA SULLA STAMINALITÀ E IL DIFFERENZIAMENTO OSTEOGENICO DI CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI DA TESSUTO ADIPOSO (ASC) .....	44
Obiettivo .....	44
MATERIALE E METODO .....	46
Colture cellulari.....	46
Citofluorimetria a flusso.....	48
Proliferazione cellulare.....	48
Analisi dell'espressione genica.....	48
Attività biochimica dell'ALP.....	51
Saggio di mineralizzazione.....	51
Saggi immunoenzimatici.....	52
Analisi statistica.....	52
RISULTATI .....	53
Espressione degli antigeni di superficie.....	53

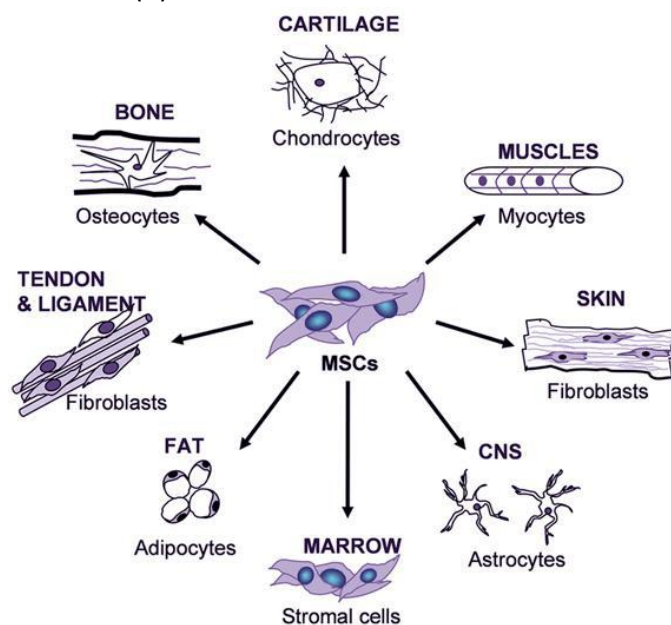
Proliferaazione cellulare .....	56
Espressione dei geni di staminalità .....	57
Espressione dei geni del differenziamento osteogenico .....	58
Mineralizzazione .....	60
Quantificazione dei fattori di crescita rilasciati dalle ASC .....	61
DISCUSSIONE.....	63
EFFETTO DELL'ACIDOSI EXTRACELLULARE SULLA STAMINALITÀ E IL DIFFERENZIAMENTO OSTEOGENICO DELLE CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI .....	68
Obiettivo .....	68
MATERIALE E METODO .....	70
Isolamento e coltura delle MSC.....	70
Proliferaazione cellulare .....	71
Saggio di crescita cellulare in condizioni di indipendenza da ancoraggio .....	71
Analisi dell'espressione genica .....	72
Analisi del ciclo cellulare .....	74
Diametro cellulare.....	74
Immunofluorescenza di Ki67 .....	75
Saggio di deposizione della matrice minerale .....	75
Analisi statistica.....	76
RISULTATI .....	77
Formazione di sferoidi cellulari in condizioni di indipendenza di ancoraggio .....	77
Espressione dei geni di staminalità .....	79
Proliferaazione cellulare .....	82
Analisi del ciclo cellulare .....	84
Differenziamento osteogenico .....	86
DISCUSSIONE.....	88
CONCLUSIONI.....	92
BIBLIOGRAFIA.....	94

## CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI

I precursori multipotenti dello stroma del midollo osseo sono state le prime cellule staminali mesenchimali ad essere identificate (1-2) e sono tuttora oggetto di interesse per la loro capacità di migrare nei tessuti danneggiati e per le funzioni di riparazione, rigenerazione e modulazione della risposta immunitaria. Caratteristiche peculiari delle cellule staminali mesenchimali (MSC) sono la capacità di self renewal e il potenziale differenziativo nei vari fenotipi del foglietto germinativo mesenchimale(3) (Figura 1).

Nel midollo osseo le MSC rappresentano circa lo 0.01% delle cellule mononucleate e forniscono supporto strutturale e funzionale alle cellule staminali ematopoietiche (HSC) (4-5).

Le MSC sono state isolate da vari tessuti quali placenta, sangue cordonale, tessuto adiposo (6), muscolo scheletrico (7), sangue periferico (8), polpa dentale (8), e, più recentemente, endometrio (9).



**Figura 1.** Multipotenza delle MSC. Le MSC possono differenziarsi in osteociti, condrociti, miociti, fibrociti, astrociti, cellule stromali, adipociti. (Fonte: Grassel S, Ahmed N. Influence of cellular microenvironment and paracrine signals on chondrogenic differentiation. Front Biosci. 2007 Sep 1;12:4946-56.)

## ***Caratteristiche delle MSC***

L'identificazione e la caratterizzazione delle MSC sono tuttora ampiamente discusse (10). La mancata conoscenza di marcatori specifici delle MSC e la variabilità della loro morfologia, legata alle condizioni di coltura e al passaggio, rende problematico identificarle in modo univoco. Per tale motivo, l'International Society for Cellular Therapy (ISCT) ha stabilito requisiti minimi per identificare le MSC, ovvero:

- a. L'aderenza alla plastica;
- b. L'espressione di CD73, CD90 e CD105, e l'assenza di espressione di marcatori ematopoietici;
- c. La capacità di differenziarsi in cellule mesenchimali, quali adipociti, condrociti e osteociti (3).

Tuttavia c'è ancora una forte necessità di caratterizzare ulteriormente la biologia delle cellule staminali mesenchimali. In particolare, l'aderenza alla plastica non sembra una caratteristica essenziale delle MSC. Studi recenti hanno infatti dimostrato l'esistenza di una sottopopolazione di MSC non aderenti (NA-MS) che presentano la stessa multipotenza delle MSC aderenti. Inoltre, le MSC non aderenti esibiscono la stessa capacità di migrare nei tessuti danneggiati *in vivo*, come le MSC aderenti, oltre a svolgere le stesse funzioni nella riparazione e rigenerazione tissutale (11-12).

Gli antigeni di superficie sono un aspetto della caratterizzazione delle MSC da considerare con attenzione perché l'espressione dei marcatori varia in base al microambiente circostante, alla durata della coltura e agli stimoli esogeni (10).

In ultimo, a proposito della multipotenza, è ancora fortemente dibattuta l'esistenza di una sottopopolazione di MSC del midollo osseo capace di differenziare non solo lineage mesenchimale, ma anche nelle linee, rispettivamente, dei foglietti germinativi ectodermico ed endodermico (13-15).

Ulteriore interesse per le MSC adulte è suscitato da altre due caratteristiche: le proprietà immunoregatorie e la capacità e specificità di homing di tali cellule.

## ***Proprietà immunoregolatorie delle MSC***

Una delle proprietà funzionali delle MSC più ampiamente descritta è il potente effetto sul sistema immunitario. Infatti, è ben noto che le MSC hanno la capacità di sopprimere la risposta immunitaria (16-20). Tuttavia, è stato anche dimostrato che le MSC possono funzionare come cellule che presentano l'antigene (APC) (21-22).

Quest'ultima caratteristica delle MSC è stata sfruttata con successo in ambito clinico per superare la "*graft versus host disease*" (GVHD) dopo il trapianto di cellule staminali emopoietiche (23). Inoltre, le MSC sono state usate per ridurre l'infiammazione nel morbo di Crohn (24) e ridurre gli effetti autoimmunitari che contrastano l'*engraftment* (25).

Numerose caratteristiche delle MSC contribuiscono agli effetti immunosoppressivi. Queste cellule sono caratterizzate da una bassa espressione del Complesso Maggiore di Isotocompatibilità (MHCII) e delle molecole co-stimolatorie (B7-1 e B7-2); inoltre esse interferiscono con varie vie della risposta immunitaria tramite interazioni cellula-cellula e secrezione di fattori solubili, come i membri della famiglia dei transforming growth factor- $\beta$  (TGF $\beta$ ), le interleuchine 6 e 10 (IL-6 e IL-10), le metalloproteinasi della matrice (MMP), l'ossido nitrico e l'indoleamina 2,3 deossigenasi. Diversi studi hanno riportato che la capacità delle MSC di inibire la proliferazione delle cellule T avviene molto probabilmente tramite la produzione di prostaglandina E2 (26).

Inoltre, le MSC possono rallentare la maturazione e la funzione delle cellule dendritiche e inibire la proliferazione, il differenziamento e la chemiotassi delle cellule B *in vitro* (16, 27-28).

Le proprietà immuostimolatorie delle MSC sono state meno studiate e sembra che dipendano dalla produzione di citochine proinfiammatorie (29). La duplice funzione immunoregolatoria sembra dipendere dal numero di cellule: un alto numero di MSC inibisce la proliferazione dei linfociti, mentre un basso numero sembra stimolarli (30). Quest'ultima osservazione ha importanti implicazioni nell'utilizzo delle MSC nelle terapie cellulari, poiché la dose cellulare è critica per le funzioni *in vivo*.

## ***Homing delle MSC***

Un'importante caratteristica che distingue le MSC è capacità di migrare. Alcuni studi hanno chiaramente dimostrato che quando le MSC sono somministrate localmente o per via sistemica esse migrano selettivamente a siti di lesione tissutale (31-32). In condizioni patologiche si può osservare un incremento delle MSC circolanti, il che suggerisce l'esistenza di nicchie di cellule mesenchimali che colonizzano i siti di lesione dove partecipano alla rigenerazione del tessuto danneggiato (33). L'*homing* delle MSC così come la presenza di fattori chemotattici specifici nei tessuti danneggiati sono tuttora quesiti aperti che potrebbero avere come denominatore comune l'infiammazione. L'alta concentrazione di chemochine infiammatorie rilasciate nei tessuti dopo il danno può modulare la migrazione delle MSC, che esprimono recettori per chemochine come CCR2, CCR3, CCR4 e CCL5, ma anche recettori per numerosi fattori di crescita, come il PDGFR e lo IGF-1 (34). E' interessante notare che esiste una stretta connessione tra tessuti danneggiati, infiammazione e cancro, descritta per la prima volta dal gruppo di Mina Bissell (35). Infatti la ricercatrice ha dimostrato che l'infiammazione è un fattore critico per lo sviluppo dei tumori nei polli infetti dal virus del sarcoma di Raus. Durante la risposta infiammatoria causata dalla lesione e dalla secrezione di TGF $\beta$  e FGF, sono rilasciate una pletera di citochine stimolanti la divisione cellulare. L'elevata attività mitotica è l'elemento chiave nello sviluppo tumorale (35). Le conoscenze attuali sui meccanismi che guidano la migrazione e l'*homing* delle MSC derivano da studi su leucociti (36) e cellule staminali ematopoietiche (37). Le interazioni iniziali tra i leucociti circolanti e le cellule endoteliali, chiamate "*rolling contacts*", sono mediate dalle selectine (38). In seguito, l'attivazione delle integrine tramite le chemochine determina la formazione di un contatto più stabile che determina lo stravasamento leucocitario (39). Le MSC derivanti dal midollo osseo esprimono varie integrine sulla loro superficie, tra cui la  $\alpha4/\beta1$ , che media l'interazione cellula-cellula e cellula-matrice extracellulare tramite il legame con la *vascular cell adhesion molecule* (VCAM-1) e con la regione V della fibronectina.

Tra le chemochine implicate nell'*homing* delle MSC, lo *stromal cell-derived factor 1* (SDF1) sembra svolgere un ruolo fondamentale tramite il suo recettore specifico CXCR4. Tuttavia sulla superficie delle MSC sono presenti solo bassi livelli del recettore



di SDF-1, CXCR4, mentre alti livelli del recettore sono stati trovati a livello intracellulare e sembra che abbiano funzione di riserva. Infatti il CXCR4 intracellulare può traslocare sulla membrana dopo lo stimolo delle chemochine, contribuendo alla migrazione delle MSC (40). Inoltre le MSC sono capaci di secernere differenti metalloproteasi, come MMP-2 e MT-MMP, che degradano la matrice extracellulare e permettono lo stravasamento e la migrazione subendoteliale (39).

Il preciso meccanismo che regola l'*homing* delle MSC non è ancora del tutto chiaro, ma rappresenta un interessante oggetto di ricerca per le sue implicazioni nelle applicazioni terapeutiche delle MSC, sia come effettori riparativi che come vettori di segnali specifici.

## ***La multipotenza e il differenziamento delle MSC***

Recentemente sono stati condotti studi sulla multipotenza delle MSC che hanno messo in luce le vie di segnalazione coinvolti nel differenziamento verso le varie linee cellulari, permettendo di acquisire conoscenze utili per le applicazioni terapeutiche e di ingegneria tissutale.

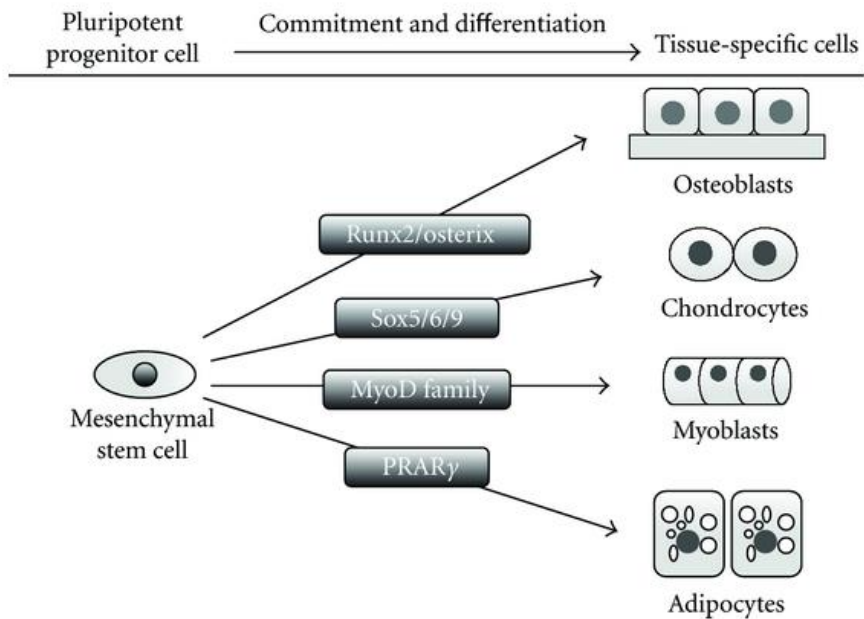
Runx2 è il principale fattore di trascrizione per la modulazione del differenziamento osteogenico (41). Esso agisce sinergicamente con il TGF $\beta$  per regolare l'espressione dell'interleuchina 11 (IL-11), la quale riduce il differenziamento adipogenico e promuove quello osteoblastico e condrocitico. L'inibizione dell'adipogenesi da parte di Runx2 è un effetto mediato dall'interazione diretta con il PPAR- $\gamma$ , un fattore di induzione adipogenico (42). Mentre Runx2 agisce primariamente per promuovere il differenziamento osteoblastico, Osterix, un ulteriore induttore osteogenico, sopprime la condrogenesi e promuove l'osteogenesi nelle fasi successive. Bassi livelli di Osterix sono sufficienti per inibire la condrogenesi, mentre alti livelli di espressione sono necessari per il differenziamento osteogenico (43). *Ex vivo*, le MSC riescono a differenziarsi con successo in osteoblasti dopo esposizione a vari stimoli, ad esempio a fattori di crescita, quali la BMPs e Wnt (44), a campi magnetici e alla coltura in terreni addizionati con fattori osteo-induttori, quali il desametasone e l'ascorbato. La capacità selettiva di promuovere il differenziamento osteogenico ha varie implicazioni cliniche.

La condrogenesi è un evento cellulare multifase che richiede il commissionamento delle MSC, seguito dalla loro aggregazione e differenziamento in condrociti (45). Il differenziamento *in vitro* delle MSC nella linea condrogenico è stato studiato tramite l'esposizione a fattori di crescita, co-coltura con cartilagine e nucleo polposo e l'espressione di geni del differenziamento condrogenico, come SRY-box9 (Sox 9). Sox9 coopera con le proteine a valle Sox5 e Sox6 per indurre la proliferazione dei condrociti, e la maturazione e la formazione della matrice con le caratteristiche proprie della cartilagine (46). Inoltre il TGF $\beta$  sembra giocare un importante ruolo del differenziamento condrogenico, che aumenta quando il TGF $\beta$  è somministrato assieme alla BMP-2 (47). La capacità di modulare il differenziamento condrogenico nelle MSC

ha rilevanti implicazioni cliniche per il trattamento di varie condizioni patologiche, come ad esempio la degenerazione del disco intervertebrale (48).

Anche la capacità di differenziamento adipogenico è stata ampiamente studiata. Il PPAR- $\gamma$  gioca un ruolo critico in questo processo regolando la funzione di geni specifici degli adipociti (49). Inoltre, il PPAR- $\gamma$  interagisce con i membri della famiglia di CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) per regolare l'adipogenesi (49). C/EBP non promuove l'adipogenesi in assenza di PPAR- $\gamma$ ; infatti PPAR- $\gamma$  è necessario e sufficiente per l'adipogenesi, e il C/EBP induce il differenziamento degli adipociti nell'ultima fase in cui agisce il PPAR- $\gamma$ . In coltura, le MSC possono essere indotte verso l'adipogenesi tramite l'aggiunta al terreno di fattori quali desametasone, isobutilmetilxantina e indometacina che, combinati, portano ad un aumento dell'espressione del PPAR- $\gamma$  e di altri specifici fattori adipogenici, come la lipoproteina lipasi (50). I meccanismi molecolari nell'adipogenesi sono possibili candidati per il trattamento dell'obesità e altri disordini correlati.

Il trattamento delle MSC con 5-azacitidina promuove il differenziamento in cardiomiociti e porta a un miglioramento della funzionalità cardiaca in modelli animali di infarto miocardico (51). Invece quando sono incubate con nicotinamide e beta-mercaptoetanololo, le MSC si differenziano in isole pancreatiche e modulano i livelli di glucosio in modelli animali.



**Figura 2.** Modello schematico del differenziamento delle MSC in cellule tessuto-specifiche. Ogni programma di differenziamento è regolato da specifici fattori di trascrizione: Runx2/Osterix per gli osteoblasti, SOX9 per i condrociti, MyoD per i mioblasti e PPAR $\gamma$  per gli adipociti (Fonte: Jimi E, Hirata S, Osawa K et al. *The current and future therapies of bone regeneration to repair bone defects. Int J Dent.* 2012;2012:148261).

## **Fonti di MSC**

### **Midollo osseo**

Il midollo osseo adulto è definito come un organo composto dall'associazione di due principali tessuti, il tessuto ematopoietico e lo stroma di supporto, i quali cooperano nelle loro funzioni.

Le MSC occupano distretti anatomici precisi del midollo; nello specifico esse sono localizzate all'interno di nicchie dell'endostio, dello stroma e perivascolari (53). Le MSC derivate dalla nicchia endostale rivestono la superficie ossea dove sono associate a osteoblasti e HSC. In questa sede, le MSC forniscono una fonte di osteoprogenitori e contribuiscono indirettamente all'osteogenesi tramite la secrezione di fattori di crescita e chemochine (54). L'ipotesi della nicchia vascolare delle MSC deriva da osservazioni *in vitro* che dimostrano la similitudine tra i periciti e le MSC (55). Questa ipotesi è stata confermata dimostrando *in vivo* la localizzazione nel sito perivascolare del midollo di una popolazione di progenitori cellulari multipotenti e capaci di auto-rinnovarsi (56). Tra l'altro, le MSC rivestono un ruolo fondamentale nel mantenimento del pool di cellule staminali ematopoietiche quiescenti nel midollo osseo (57). Si ritiene che le MSC che esprimono la nestina si co-localizzano con le HSC nei siti perivascolari dell'endostio e dello stroma. Inoltre, esse esprimono i geni per il mantenimento delle HSC, fra cui CXCL12, e sono associate alle fibre nervose del sistema simpatico che regolano le HSC nel flusso sanguigno (58).

Friedenstein e collaboratori sono stati i primi ad utilizzare tecniche *in vitro* e *in vivo* per caratterizzare le cellule che compongono lo stroma del midollo osseo (2). Le modalità con cui le MSC vengono coltivate *in vitro* variano considerevolmente. I protocolli di isolamento tipicamente utilizzano la centrifugazione su gradiente di densità per separare la frazione delle cellule mononucleate dalle altre componenti del midollo (eritrociti, plasma e lipidi). La frazione delle cellule mononucleate contiene una popolazione cellulare eterogenea arricchita di linfociti B e T, monociti, HSC, progenitori endoteliali e MSC. In seguito alla semina di MSC, queste rappresentano la popolazione cellulare che cresce in adesione e forma colonie di cloni cellulari. È generalmente noto che le MSC aderiscono alla plastica dopo pochi giorni dalla semina iniziale e che la coltura cellulare diventa priva di cellule ematopoietiche non aderenti in seguito ai

ripetuti cambi di terreno di coltura. Per ottenere una popolazione maggiormente purificata posso essere anche utilizzate biglie magnetiche per isolare le cellule in base alla granularità cellulare o all'espressione di antigeni di superficie. Al passaggio zero la popolazione delle MSC è morfologicamente indistinguibile: le cellule sono piccole, fibroblastoidi e proliferanti (59). La popolazione cellulare tende a diventare morfologicamente più omogenea con la successiva espansione *in vitro*. L'arresto della crescita cellulare è spesso dipendente dalla variabilità del donatore, e ciò avviene tra il decimo e il trentottesimo passaggio di coltura (59), ed è associato alla riduzione della lunghezza dei telomeri (60); tuttavia, le modificazioni epigenetiche così come la metilazione del DNA possono avere un ruolo cruciale (61). In particolare, nelle colture senescenti i geni associati al ciclo cellulare, alla replicazione e alla riparazione del DNA sono poco espressi (62). In seguito a colture *in vitro* prolungate, le MSC sembrano perdere la multipotenza e mostrano una predisposizione verso il differenziamento osteogenico (63).

Ci sono evidenze sperimentali che suggeriscono che la semina cellulare delle MSC a bassa densità aumenti la proliferazione, poiché si riduce il rischio di inibizione da contatto (63).

Le MSC sono comunemente espansi in un mezzo di coltura basale quale il "Dulbecco's modified Eagle's medium" (DMEM)/DMEM F-12 oppure alpha-MEM supplementato del 10% di siero fetale bovino (FBS). In alternativa, le MSC possono essere coltivate usando siero autologo, lisato piastrinico, plasma ricco di piastrine (PrP), fattori di crescita o in assenza di siero (64).

In assenza di marcatori universali specifici, le MSC sono identificate in base ad un repertorio di proteine espresse sulla superficie cellulare. Nel 2006 la International Society for Cellular Therapy ha proposto un pannello di marcatori di superficie positivi e negativi da utilizzare per la caratterizzazione delle MSC (10): sono definite MSC le cellule positive al 95% per CD105, CD73 e CD90 e negative al 95% per CD45, CD34, CD14, CD19 e HLA-DR. Esistono altri marcatori di superficie espressi dalle MSC, ma in percentuale variabile: CD44 (65), CD166 (66), Stro-1 (65), CD106 (66), CD146 (65).

## Tessuto adiposo

I primi studi sulle cellule staminali da tessuto adiposo sono cominciati nel 1992 (67). I ricercatori utilizzarono il grasso peritoneale del maiale, dal quale era stata isolata la frazione vascolare stromale (SVF) posta in coltura in terreno addizionato di eparina e "endothelial growth factor" (EGF). Questo tipo di coltura aveva dato origine a cellule positive alla colorazione per il fattore di von Willebrand (vWF), all'alpha-smooth muscle cell actin ( $\alpha$ -SMA) e alla citocheratina. Studi più recenti hanno dimostrato che l'SVF include cellule staminali mesenchimali multipotenti (68-69).

Il tessuto adiposo deriva dal mesoderma embrionale. Ugualmente alle MSC, le cellule isolate da tessuto adiposo sono capaci di differenziarsi in osso, cartilagine, muscolo e ovviamente in tessuto adiposo (70). Nel 2004, alla conferenza della International Fat Applied Technology Society, si è raggiunto il consenso sul termine "adipose-derived stem cells" (ASC) (71).

Un numero abbondante di ASC può essere derivato dal tessuto adiposo intatto scartato durante gli interventi di liposuzione. Le ASC confrontate con le cellule mesenchimali derivanti da midollo osseo sono più semplici da coltivare *in vitro*, hanno una proliferazione più rapida (71), e possono anche essere mantenute in coltura più a lungo prima di diventare senescenti. Queste caratteristiche fanno delle ASC una vantaggiosa fonte di cellule staminali mesenchimali.

Le cellule staminali adipose si possono trovare in alcuni tipi di tessuto adiposo, come il sottocutaneo e l'omento. Il tessuto adiposo deve essere processato prima possibile dopo la raccolta, oppure, riposto a temperatura ambiente una notte prima dell'isolamento delle cellule (72). In letteratura sono descritte varie metodiche per l'isolamento di cellule stromali adipose. Il tessuto adiposo è digerito con collagenasi di Tipo I per rimuovere gran parte della matrice extracellulare, filtrato e centrifugato. Il pellet ottenuto è noto come SVF, le cellule all'interno della SVF aderiscono alla plastica in condizioni standard di coltura, e la crescita delle cellule avviene in pochi giorni.

La SVF contiene una popolazione eterogenea di cellule stromali, comprese le ASC. Gli altri tipi di cellule che possono essere presenti nella SVF sono le cellule endoteliali, le cellule della muscolatura liscia, i periciti, i fibroblasti e le cellule circolanti, come i leucociti, le cellule staminali ematopoietiche e cellule progenitrici endoteliali (70).

Alcuni autori usano nei loro esperimenti l'intera SVF non purificata, basandosi sul presupposto che le ASC sono cellule aderenti alla plastica, quindi si auto-selezionano dalla SVF durante i passaggi successivi della coltura (73). Alcuni studi hanno riportato che il tessuto adiposo aspirato contiene un numero inferiore di ASC rispetto al tessuto adiposo intatto (73), e molti più adipociti e cellule non vitali (74). Il ridotto numero di ASC nel tessuto adiposo aspirato potrebbe principalmente dipendere da due motivi: a) la quantità prevalente delle ASC non è aspirata durante la procedura chirurgica poiché le cellule sono localizzate attorno ai vasi (nella tunica avventizia); b) alcune ASC sono rilasciate nella porzione fluida del lipoaspirato (75). I vasi sanguigni sono presenti nella parte fibrosa del tessuto intatto e non in quello aspirato. Pertanto il tessuto adiposo aspirato confrontato con il tessuto intatto è considerato una fonte di ASC meno ricca di progenitori multipotenti.

Risulta anche che le ASC possono fornire supporto angiogenico ed ematopoietico (76-77). Pochi studi clinici sono stati eseguiti con le ASC e i dati attuali sono limitati a casi clinici isolati e a protocolli di fase 1.

Uno dei maggiori problemi riguardanti le ASC è la mancanza di standardizzazione dei metodi per l'isolamento e la coltura.

La scoperta di marcatori specifici delle ASC, potrà effettivamente migliorare la ricerca, e consentire un rapido sorting delle ASC. È anche necessario un sicuro, veloce ed efficiente protocollo per il differenziamento delle ASC., occorrono circa due settimane, tuttavia il processo di differenziamento osteogenico e condrogenico richiede più tempo e la resa cellulare è ancora piuttosto scarsa. L'identificazione di matrici funzionali per le colture in 3-D delle ASC e il miglioramento nei tempi di differenziamento renderanno le ASC più interessanti per applicazioni di ingegneria tissutale.

Le linee guida per le applicazioni cliniche di terapia cellulare suggeriscono di sostituire il siero fetale bovino con supplementi di origine umana. Un candidato sembra il lisato piastrinico (PL), che può migliorare la sicurezza, la qualità e la proliferazione delle ASC espanse *in vitro*. Il PL, ottenuto concentrando le piastrine umane, contiene PDGF, FGF, VEGF, IGF-I e TGFβ. Sono state analizzate varie caratteristiche delle ASC in coltura con il PL, osservando una incrementata proliferazione e un profilo di marcatori di superficie del tutto simile a quello delle ASC in coltura con siero bovino (78).



Alcuni studi hanno riportato caratteristiche immunosoppressive nelle ASC impiantate simili a quelle delle MSC da midollo osseo (79). Nonostante l'immunosoppressione locale possa essere una caratteristica utile in alcuni contesti clinici, questa può anche rappresentare un potenziale rischio, ad esempio permettendo a tumori occulti di eludere l'immunosorveglianza (71). Solo trials clinici su larga scala potranno chiarire il rapporto rischio-beneficio delle terapie con ASC. Tuttavia, grazie alla facile reperibilità del tessuto adiposo, è probabile che in futuro le ASC possano trovare vasta applicazione nella pratica clinica.

## **Polpa dentale**

La polpa, un tessuto connettivo molle contenuto all'interno della corona dentale, è un'interessante fonte di cellule staminali adulte poiché contiene una grande quantità di cellule la cui procedura di isolamento è poco invasiva rispetto ad altre fonti di tessuti adulti (80-81). Durante lo sviluppo embrionale, la polpa dentale è definita come un tessuto "ectomesenchimale" poiché deriva dalle cellule ectodermiche che circondano il tubo neurale, le quali migrano verso la regione orofacciale, e in seguito si differenziano in cellule mesenchimali (82). A livello funzionale, la polpa dentale è responsabile del mantenimento e della riparazione del tessuto parodontale (83). La polpa dentale contiene cellule staminali mesenchimali note come "Dental Pulp Stem Cells (DPSC)". Le DPSC sono ottenute da denti umani decidui e permanenti, da denti umani del giudizio, da denti umani decidui esfoliati e dalla papilla apicale (79, 84-85). Le DPSC, inoltre, possono essere anche isolate da denti in soprannumero (86).

Le DPSC possono differenziarsi in vari tipi di cellule (86-91). Sono noti due metodi di isolamento delle DPSC: il metodo meccanico e il metodo enzimatico. Il primo prevede la crescita delle cellule dai frammenti di tessuto e la successiva adesione alla superficie plastica del supporto di coltura cellulare (91-92). Il secondo protocollo consiste nella rimozione chirurgica della polpa dentale, la digestione enzimatica con collagenasi/dispasi, la caratterizzazione e la selezione tramite specifici marcatori. L'isolamento con digestione enzimatica spesso prevede la selezione utilizzando la citometria a flusso con funzione di "sorting" (FACS) che permette di isolare le DPSC per la loro morfologia (complessità e dimensione delle cellule) e gli antigeni di superficie (81).

I diversi marcatori delle MSC sono usati per selezionare la popolazione cellulare delle DPSC (93-94). Yang e colleghi hanno dimostrato che le DPSC che esprimono STRO1 identificano una sottopopolazione di DPSC con proprietà osteogeniche ed odontogeniche (95). Un'altra popolazione di DPSC è CD34 e CD117 positiva e CD45 negativa (80). Tale popolazione ha notevoli capacità di auto-espansione e di differenziamento osteogenico. Le DPSC possono essere espanse per lunghi periodi di tempo e amplificate per più di 80 passaggi mantenendo tuttavia la loro plasticità e la capacità di formare *in vitro* noduli minerali (81, 96).

Altri antigeni di superficie espressi dalle DPSC sono il CD29 e il CD44 (97) oltre che il CD73 e il CD105 (98), canonici marcatori delle cellule mesenchimali. Le DPSC esprimono anche OCT4 e Nanog, fattori trascrizionali implicati nel mantenimento della pluri/multipotenza (99).

La polpa dentale è una potenziale fonte di cellule staminali per applicazioni di medicina rigenerativa in campo ortopedico, odontostomatologico e maxillo-facciale. La capacità rigenerativa delle DPSC può essere implementata tramite l'utilizzo di scaffold porosi che migliorano l'attecchimento delle cellule nel sito di lesione inducendo la rigenerazione tissutale. Sono stati utilizzati molteplici materiali per produrre scaffold, quali nanofibre di collagene, acido polilattico, chitosano e fibrina PEGilata. Vari autori hanno dimostrato che le DPSC sono capaci di differenziarsi in osteoblasti quando sono coltivate nel mezzo di coltura addizionato con desametasone, acido ascorbico e  $\beta$ -glicerofosfato (100-101).

Le DPSC possono anche differenziarsi in altri tipi cellulari, quali condrociti, cellule muscolari lisce, adipociti e neuroni (93, 102-104); Inoltre, quando le DPSC sono coltivate con VEGF, sono capaci di formare strutture simili ai capillari (105).

Un ulteriore aspetto ampiamente studiato delle DPSC è il mantenimento dello stato di staminalità. Le DPSC trattate con concentrazioni ottimali di piccole molecole (Pluripotin (SC1), rapamicina e 6-bromoindirubin-3-oxime) mostrano un maggiore livello di trascritto di STRO-1, NANOG, OCT4 e SOX2, ma una diminuita capacità differenziativa *in vitro* nelle linee odonto/osteogenica, adipogenica e neurogenica (106).

Un altro aspetto da considerare è la capacità delle DPSC di mantenere le loro caratteristiche dopo anni di criopreservazione (107).

## POTENZIALE TERAPEUTICO DELLE MSC

Le peculiari caratteristiche delle MSC, come la loro multipotenza, le proprietà immunoregolatorie e l'*homing*, creano aspettative sulla possibilità di sfruttare tali cellule per gli approcci terapeutici. Infatti, le MSC sono facilmente isolate dal midollo osseo, dal tessuto adiposo e dalla polpa (108), e possono essere somministrate ai pazienti in modo autologo, prevenendo reazioni del sistema immunitario.

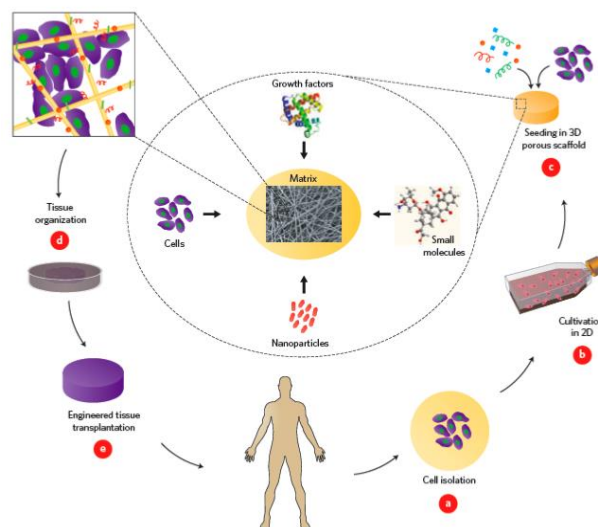
Le MSC sono state utilizzate per trattare malattie cardiovascolari. In particolare l'infarto miocardico è stato argomento di studio per l'utilizzo di terapie cellulari con MSC. Non è chiaro se le MSC siano capaci di differenziarsi in cardiomiociti e, in tal caso, tramite quali segnali. Esperimenti condotti sui roditori con l'iniezione intravenosa di MSC dimostrano che la maggior parte delle cellule viene intrappolata nei polmoni (109-110). Inoltre, solo una piccola percentuale di MSC inoculate nei suini è trattenuta nel miocardio dopo due settimane dal trapianto, usando diverse strategie di somministrazione (111). Per questo motivo si pensa che gli effetti rigenerativi delle MSC sul cuore danneggiato non siano dovuti solo alla capacità di questi elementi di differenziarsi in cardiomiociti, ma anche al rilascio di fattori trofici e a un'azione anti-infiammatoria.

Le MSC sono anche usate per il trattamento di malattie neurologiche e neurodegenerative, come la malattia di Alzheimer, il morbo di Parkinson e la corea di Huntington. In questi casi, il potenziale differenziativo può dipendere dalla capacità delle MSC di secernere localmente elevate quantità di *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), *nerve growth factor* (NGF), *vascular endothelial growth factor* (VEGF) e *hepatocyte growth factor* (HGF). Infatti esperimenti *in vitro* hanno dimostrato che l'espressione di questi fattori aumenta quando le MSC sono esposte ad estratti cerebrali danneggiati (112). Inoltre la capacità di regolare la risposta immunitaria può essere cruciale per malattie neurodegenerative caratterizzate da infiammazione cronica. Tuttavia, diversi studi hanno suggerito il trans-differenziamento di MSC derivate da midollo osseo in cellule di tipo neuronale tramite induzione *in vitro* con specifici fattori (113-114).

Infine, le MSC possono riparare lesioni renali acute in modelli murini. Anche in questo caso il preciso meccanismo con cui le MSC riparano i tessuti lesionati non è noto.

Alcuni studi hanno dimostrato che MSC inoculate nell'epitelio tubulare transdifferenziavano ed erano responsabili della riparazione strutturale e funzionale del rene (115). Tuttavia evidenze sperimentali rivelano che solo il 2-2,5% delle MSC è attecchisce (116). Pertanto come suggerito da successivi studi su roditori, il rilascio di fattori che possono modulare la risposta immunitaria e avere attività trofica, pro-angiogenica e mitogena è probabilmente il meccanismo d'azione principale con cui le MSC sono in grado di riparare un danno renale (117-118).

Le MSC sono state ampiamente studiate e saggiate in clinica per il loro ruolo nella riparazione e rigenerazione del tessuto osseo. MSC allogene sono state usate per il trattamento di malattie ossee come l'osteogenesi imperfetta, l'osteonecrosi e le pseudoartrosi (119-123) (Figura 3). Il vantaggio di usare precursori mesenchimali osteogenici si basa non solo sulla capacità delle MSC di differenziarsi in osteoblasti, ma anche sulla loro capacità di fornire segnali trofici come fattori di crescita e citochine ai tessuti danneggiati, accelerando in tal modo il processo di rigenerazione (124).



**Figura 3.** I principi dell'ingegneria tissutale. a) le cellule possono essere isolate dal paziente. b) le cellule sono coltivate ed espanse in vitro. c) le cellule sono seminate con scaffold 3D porosi. d) organizzazione tissutale. e) trapianto del tessuto ingegnerizzato. (Fonte: Dvir T, Timko BP, Kohane DS et Al. *Nanotechnological strategies for engineering complex tissues. Nat Nanotechnol.* 2011 Jan;6(1):13-22).

## ***Applicazione delle MSC nella riparazione del tessuto osseo***

La riparazione del tessuto osseo danneggiato può essere ottenuta efficacemente qualora siano soddisfatti alcuni criteri, ovvero è necessario:

- a. generare un numero di cellule sufficiente a completare la riparazione del difetto osseo;
- b. indurre il differenziamento delle cellule verso il corretto fenotipo e il mantenimento di questo;
- c. evitare il de-differenziamento delle cellule verso fenotipi non specifici.

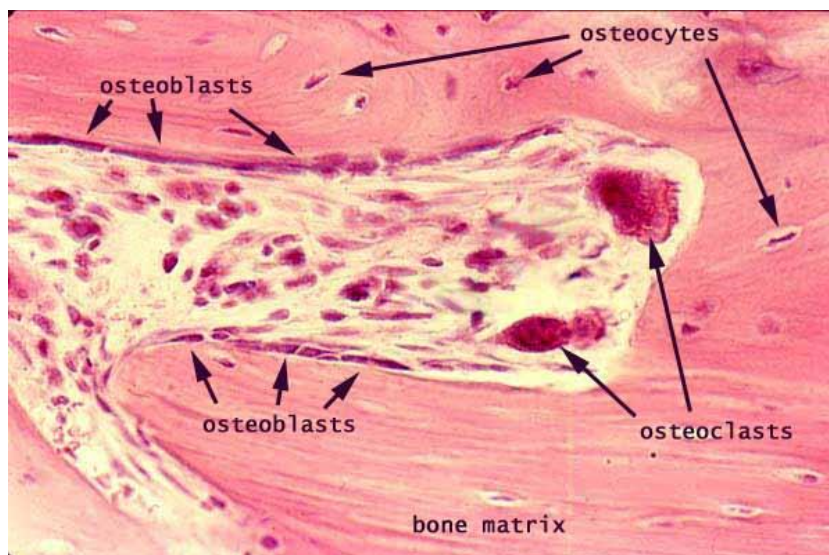
Le cellule inoltre devono essere in grado di organizzarsi nello spazio in senso tridimensionale, produrre matrice extracellulare, promuovere la vascolarizzazione del tessuto neoformato e integrarsi con il tessuto ospite.

Il midollo osseo autologo è la fonte di MSC più usata per applicazioni di medicina rigenerativa in ortopedia. Tuttavia, data la bassa frequenza di MSC nel midollo osseo di un adulto sano (0.001 – 0.01%), molti autori ritengono che per ottenere un numero consistente di cellule disponibili per la riparazione di difetti ossei di grandi dimensioni sia necessario espandere le cellule *ex vivo* (125). Questa fase di espansione tuttavia può creare problemi. Come detto in precedenza, le MSC tendono a perdere le loro caratteristiche differenziative con l'aumentare del numero delle divisioni cellulari, quando sono coltivate in condizioni standard. Ne consegue che è di primario interesse il mantenimento della loro "staminalità" e la possibilità di riprogrammare la loro capacità differenziativa per sfruttare il loro utilizzo in medicina rigenerativa. La filosofia di base delle moderne biotecnologie è quella di utilizzare ed eventualmente anche di oltrepassare le leggi della fisiologia per ottenere un beneficio terapeutico. Di conseguenza, forzare una popolazione cellulare a compiere *in vitro* un numero di divisioni cellulari che mai sarebbe raggiunto *in vivo*, potrebbe anche essere accettabile, sempre che le cellule così ottenute mantengano le caratteristiche originarie. In generale, qualunque sia la strategia adottata, l'uso delle MSC in ortopedia ha come obiettivo prioritario quello di ricostruire il tessuto osseo nella sua integrità.

## ***Il tessuto osseo***

L'osso è un tessuto connettivo specializzato e caratterizzato dalla matrice mineralizzata con il calcio fosfato nella forma di cristalli di idrossiapatite. L'osso svolge una funzione strutturale, che fornisce la mobilità, il supporto e la protezione del corpo; inoltre ha un importante ruolo di riserva di calcio e fosforo. Morfologicamente, il tessuto osseo si distingue in osso spugnoso o trabecolare e in osso corticale o compatto. Dal punto di vista funzionale, l'osso trabecolare è strettamente associato alle funzioni metaboliche, mentre l'osso corticale fornisce la funzione meccanica (119).

La composizione del tessuto osseo comprende cellule specializzate, quali osteoblasti, osteociti, bone lining cells, e osteoclasti, e una matrice extracellulare che contiene componenti organiche e inorganiche. Gli osteoblasti, che maturano in osteociti, sono responsabili della deposizione della matrice mineralizzata e della secrezione dei fattori di crescita necessari per l'osteogenesi. Gli osteoclasti, derivanti dalla linea monocito-macrofagica, svolgono un ruolo fondamentale nel processo di rimodellamento osseo (Figura 4). La matrice extracellulare è composta da proteine collagene (prevalentemente collagene di Tipo I) e non-collagene (osteocalcina, osteopontina e sialoproteina ossea) (127).

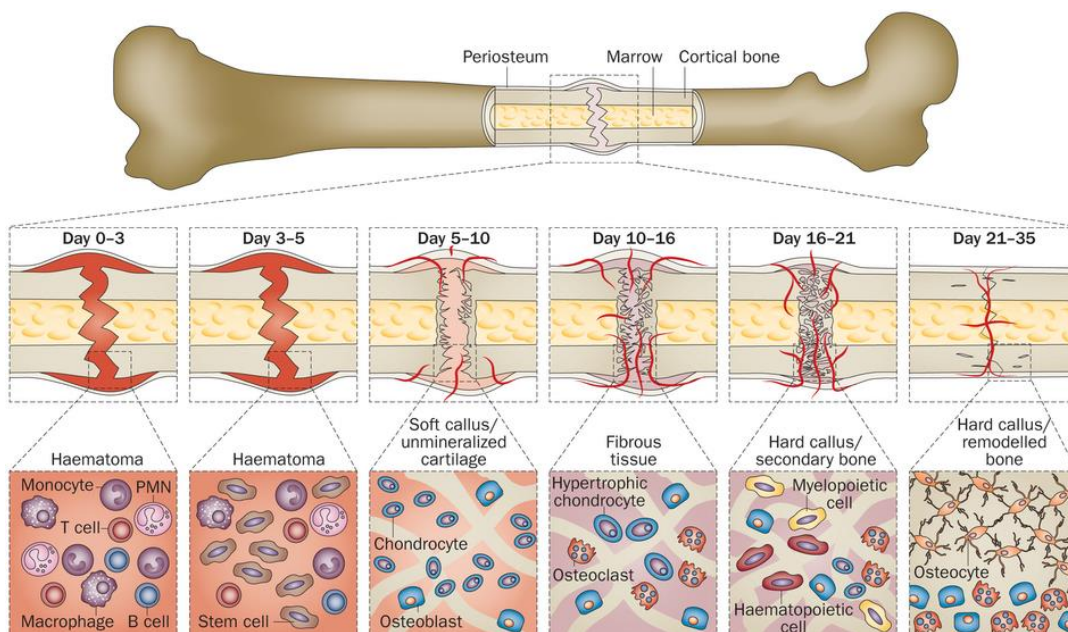


**Figura 4.** Istologia del tessuto osseo. Sono apprezzabili gli osteoblasti, gli osteoclasti, gli osteociti e la matrice ossea.

(Fonte:<http://www.siumed.edu/~dking2/ssb/remodel.htm>).

## ***Il processo di guarigione ossea***

L'articolata serie di eventi cellulari che regolano il processo di guarigione ossea sono stati ampiamente studiati su modelli sperimentali (128). Istologicamente si distinguono una fase infiammatoria precoce (ematoma, infiammazione, angiogenesi) con formazione del tessuto di granulazione, una fase riparativa, caratterizzata dalla formazione del callo cartilagineo e osseo immaturo e, successivamente, dalla sostituzione del callo con osso lamellare, e una fase di rimodellamento tardiva, che consente, nel tempo, di ripristinare la morfologia ossea (Figura 5).



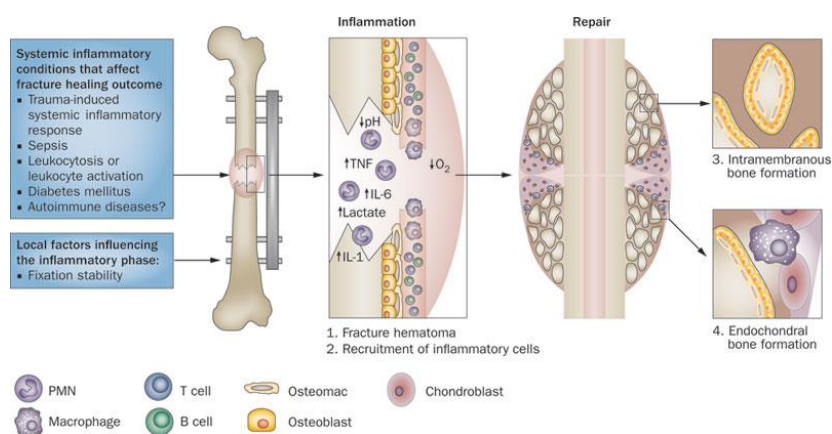
**Figura 5.** Fasi del processo di guarigione ossea. Formazione dell'ematoma (fase infiammatoria); formazione del callo cartilagineo; formazione del tessuto fibroso; formazione del callo osseo; rimodellamento osseo. (Fonte: *Einhorn TA, Gerstenfeld LC. Fracture healing: mechanisms and interventions. Nat Rev Rheumatol. 2015 Jan;11(1):45-54.*)



## Infiemmazione

La frattura è caratterizzata dall'interruzione dell'integrità scheletrica e dalla distruzione della struttura vascolare, con conseguente compromissione dell'apporto di nutrienti al sito della lesione (Figura 6). Ciò determina una ridotta tensione d'ossigeno e la distruzione dell'architettura midollare. L'ematoma che si genera tra i capi di frattura rappresenta una fonte di molecole segnale (fattori di crescita e citochine) per i precursori monocito-macrofagici e osteo-condroblastici (129).

I macrofagi ed altre cellule infiammatorie reclutate secernono fibroblast growth factor (FGF), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), platelet derived growth factor (PDGF), transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ), insulin-like growth factor I (IGF-I) ed una varietà di citochine, fra cui l'interleuchina 1 (IL-1) e l'interleuchina 6 (IL-6). A loro volta, tali fattori di crescita e citochine hanno un effetto chemiotattico sulle cellule infiammatorie e sui precursori osteoblastici (130). Durante la fase precoce, i precursori mesenchimali proliferano e si differenziano in senso osteogenico e condrogenico (131) si assiste inoltre alla formazione di nuovi vasi sanguigni per gemmazione dalle strutture vascolari preesistenti attraverso un'articolata catena di eventi: degradazione enzimatica della membrana basale, migrazione delle cellule endoteliali verso lo stimolo angiogenetico, proliferazione, maturazione e organizzazione delle cellule endoteliali in tubi capillari. Tale processo è regolato da FGF, vascular endothelial growth factor (VEGF) e angiopoietina 1 e 2.



**Figura 6.** L'ematoma è caratterizzato da bassa tensione di ossigeno e da pH acido; contiene citochine infiammatorie, macrofagi, linfociti e neutrofili. (Fonte: *Claes L, Recknagel S, Ignatius A. Fracture healing under healthy and inflammatory conditions. Nat Rev Rheumatol. 2012 Jan 31;8(3):133-43.*)

## **Riparazione**

L'ossificazione intramembranosa ha inizio pochi giorni dopo la lesione tissutale, mentre l'ossificazione encondrale, che coinvolge i tessuti adiacenti al sito della frattura, si sviluppa nell'arco di un mese. L'area subperiostale e i tessuti molli adiacenti al sito della frattura creano direttamente nuovo tessuto osseo. In tale processo i precursori mesenchimali reclutati al sito della lesione si differenziano in senso osteoblastico e producono sia osso compatto che osso trabecolare senza indurre la formazione di cartilagine.

L'ossificazione encondrale coinvolge invece il reclutamento e la proliferazione dei progenitori multipotenti ed il loro differenziamento in cartilagine e successivamente in osso. La proliferazione delle cellule staminali mesenchimali è già apprezzabile tre giorni dopo la frattura e rimane attiva per alcuni giorni (132).

La condrogenesi implica la formazione di un callo cartilagineo che riempie e stabilizza il sito della frattura. I condrociti del callo cartilagineo rilasciano calcio mitocondriale nella matrice e depongono collagene di tipo II ed aggregano. Dopo due settimane tali cellule diventano ipertrofiche e producono collagene di tipo X. In seguito, la membrana, parzialmente mineralizzata, è riassorbita e sostituita con una matrice formata principalmente da collagene di Tipo I.

I condrociti rilasciano fosfatasi e proteasi per preparare la matrice alla successiva mineralizzazione (133-134). L'attività delle fosfatasi consiste nel rendere disponibili gruppi fosfato, che reagiscono con il calcio rilasciato dai mitocondri determinando la precipitazione del calcio fosfato. Le proteasi degradano i proteoglicani che bloccano la mineralizzazione della cartilagine. Dopo 4-5 settimane si attivano i condroclasti, cellule multinucleate responsabili della degradazione della cartilagine calcificata. Durante il riassorbimento della matrice cartilaginea, i condroclasti inviano segnali cellulari che consentono ai vasi sanguigni di penetrare nel tessuto, trasportando cellule mesenchimali staminali perivascolari che si differenziano in cellule osteoprogenitrici. Le cellule endoteliali, assieme ad altri tipi cellulari che secernono metalloproteasi, facilitano l'invasione vascolare e la rimozione dei setti e delle strutture cartilaginee residue (135).

I tessuti derivanti dall'ossificazione intramembranosa ed encondrale crescono fino a connettersi, e dopo 6-7 settimane si osserva una combinazione di cartilagine calcificata

e nuovo osso reticolare. La transizione da cartilagine a osso coinvolge una serie di eventi programmati di rimozione cellulare e modificazione della matrice, durante la quale i condrociti vanno incontro ad apoptosi (134).

### **Rimodellamento**

La completa guarigione della frattura si raggiunge durante la fase di rimodellamento osseo, in cui osteoblasti ed osteoclasti cooperano al fine di convertire il callo della frattura in una struttura ossea capace di sostenere i carichi meccanici fisiologici.

A differenza di quanto accade nel corso dello sviluppo delle ossa lunghe, in cui la crescita apposizionale del periostio è bilanciata dal riassorbimento della superficie endostale, nel rimodellamento del callo di frattura si assiste alla rimozione esterna di osso e all'apposizione sulle superfici interne. L'osso trabecolare è riassorbito dagli osteoclasti, a livello di una cavità chiamata lacuna di Howship. Gli osteoclasti acidificano lo spazio extracellulare locale e secernono enzimi lisosomali, proteasi seriniche, collagenasi e la fosfatasi acida tartrato-resistente 5b, che degradano la matrice ossea. La distruzione enzimatica della matrice ossea determina il rilascio di varie proteine, tra cui i fattori di crescita sintetizzati durante la formazione dell'osso. Questi, assieme alle citochine prodotte dagli osteoclasti e da altre cellule, reclutano nel sito della lesione gli osteoprogenitori che si differenziano in osteoblasti. Gli osteoblasti penetrano nelle lacune di Howship, producono nuova matrice ossea di tipo intrecciato o lamellare e, rimanendovi intrappolati, si differenziano in osteociti (136). Infine alcuni osteoblasti assumono una morfologia piatta e si dispongono sulle superfici quiescenti dell'osso (c.d. *bone lining cells*).

L'angiogenesi assume un ruolo di cruciale importanza nella regolazione del rimodellamento osseo e della riparazione delle fratture. Fattori angiogenici quali VEGF ed endotelina sono in grado di regolare gli osteoclasti e gli osteoblasti. Inoltre la formazione di vasi sanguigni è funzionale al trasporto di precursori osteoclastici ed osteoblastici circolanti al sito di rimodellamento attivo. L'interfaccia tra le superfici ossee ed il midollo presenta strutture vascolari, i capillari sinusoidali paratrabecolari, che possiedono una parete interna costituita da cellule endoteliali ed una esterna formata da uno strato di osteoblasti. Il rimodellamento osseo è associato ad un flusso sanguigno più intenso attraverso i microvasi che si adattano alla superficie dell'osso spugnoso (137).

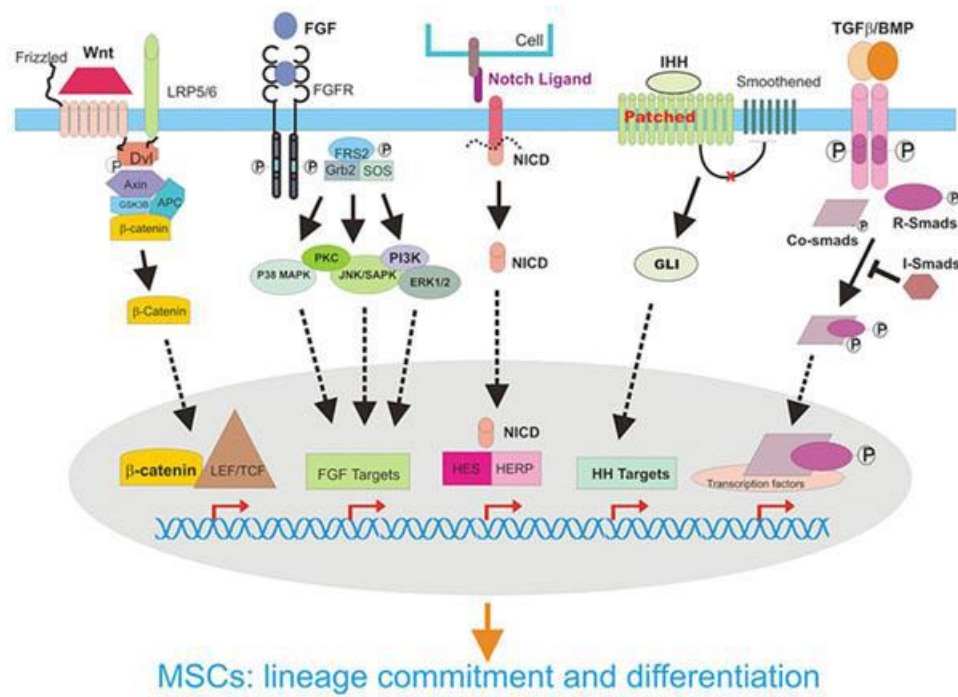
Inoltre è stata caratterizzata una struttura vascolare specializzata, il cosiddetto 'bone remodeling compartment' (BRC) (138), composta da cellule piatte con caratteristiche simili alle bone lining cells. Tali cellule esprimono le principali citochine ed i fattori di crescita osteotropi, rendendo il BRC la struttura candidata per l'accoppiamento dei processi di riassorbimento e formazione ossea.

### ***Eventi molecolari della riparazione ossea***

Il processo di guarigione ossea è il risultato dell'attività coordinata di numerosi programmi trascrizionali che regolano l'espressione di molteplici geni *osteoblast-specific* (139). La tecnologia microarray ha permesso di eseguire l'analisi su ampia scala del trascrittoma nelle diverse fasi del processo di guarigione della frattura (140).

I geni coinvolti nelle attività metaboliche o con funzione di trasporto o di legame risultano sovraespressi per 24 ore dalla frattura, fase in cui si osserva un aumento della divisione cellulare. L'analisi proteomica funzionale ha dimostrato (141) che la fase di preparazione alla riparazione ossea coinvolge la regolazione del ciclo cellulare e della segnalazione cellula-cellula, (140). Le vie di segnalazione di IGF-I, PDGF e mitogen-activated protein kinase (ERK/MAPK) giocano un ruolo fondamentale durante la fase dell'infiammazione. Quattro giorni dopo la frattura, l'ematoma presenta cellule indifferenziate e tessuto connettivo vascolarizzato, i macrofagi rimuovono i detriti ed il numero di neutrofili diminuisce. L'espressione genica, in questa fase, è caratterizzata da due categorie di geni: alla prima appartengono geni la cui espressione aumenta gradualmente dal primo al quarto giorno. Questo gruppo è costituito da geni funzionalmente associati al processo riparativo, quali IGF-I, PDGF, fibroblast growth factor receptor (FGFR), fibronectina, metalloproteasi della matrice, glicani, osteomodulina, osteonectina, tenascina C, collagene di tipo I cartilagineo (tipo VI e XI) e collagene di tipo I osseo (tipo I, V, VI, XII). Alla seconda categoria appartengono geni costantemente espressi che modulano la crescita e la sopravvivenza cellulare ed hanno funzioni di legame, trasporto e attività catalitica. Durante la fase di ossificazione diretta, che ha inizio al quarto giorno, le proteine differenzialmente espresse sono annesse agli eventi di apoptosi, di risposta immunitaria e di segnalazione cellulare. Inoltre, IL-6 risulta fortemente espressa e svolge un ruolo chiave nel coordinare i gruppi funzionali. Al settimo giorno si assiste all'inizio dell'ossificazione endocondrale caratterizzata, a livello molecolare, dall'attivazione delle vie di PDGF, VEGF, peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR) e, a valle, p13K/AKT (coinvolto nella sopravvivenza cellulare) mentre a livello istologico, si osserva la presenza di condrociti ipertrofici e di osteoclasti che rimuovono la cartilagine. Al

termine dell'ossificazione encondrale (ventottesimo giorno) inizia la fase di rimodellamento, che vede coinvolti le vie p13K/AKT, IGF-I, MAPK/ERK e delle integrine. Diverse vie di segnale sono coinvolte nella modulazione del differenziamento delle cellule mesenchimali staminali in senso osteogenico (142) (Figura 7).



**Figura 7.** Rappresentazione schematica delle vie di regolazione del differenziamento osteogenico: Wnt, FGF, Notch; TGFβ/BMP. (Fonte: Deng ZL, Sharff KA, Tang N et al. *Regulation of osteogenic differentiation during skeletal development. Front Biosci.* 2008 Jan 1;13:2001-21).

### **Via del segnale di Wnt**

Le proteine Wnt appartengono ad una famiglia di glicoproteine secrete, che legano i recettori transmembrana Frizzled (FZD) attivando a cascata due diverse vie di trasduzione del segnale: la via canonica e la via non canonica di Wnt. La prima coinvolge la formazione di un complesso tra le proteine Wnt, FZD, ed il corecettore low density lipoprotein receptor related protein (LRP) 5 o 6. Nella via non canonica, Wnt5a lega il recettore FZD ed attiva le proteine G eterotrimeriche, determinando un incremento del calcio intracellulare tramite meccanismi proteina G-dipendenti o inducendo cambiamenti Rho- o c-Jun N-terminal kinase (JNK)-dipendenti dall'actina del citoscheletro (143).

Le proteine Wnt, codificate da una famiglia di 19 geni, regolano la proliferazione cellulare, il differenziamento e l'apoptosi e sono cruciali nello sviluppo embrionale e nella rigenerazione del tessuto osseo nell'adulto (144). Evidenze sperimentali hanno dimostrato l'importante ruolo della via canonica di Wnt nella formazione del tessuto osseo e nell'espressione di marcatori specifici degli osteoblasti in vitro (145).

### **Via del segnale di TGF $\beta$**

La superfamiglia del TGF- $\beta$  consiste in molti fattori di crescita che hanno un ruolo cruciale nello sviluppo e nell'omeostasi scheletrica. Diversi membri di questa superfamiglia, come le bone morphogenetic proteins (BMP), hanno potenti effetti osteogenetici. La via del segnale della superfamiglia BMP/TGF $\beta$  è trasdotta da due differenti tipi di recettori serina/treonina-chinasici:

- tipo I: recettore delle BMP di tipo IA e IB e recettore dell'activina tipo IA;
- tipo II: recettore delle BMP di tipo II e recettore dell'activina tipo II e IIB (146).

Le BMP trasmettono segnali tramite vie Smad-dipendenti e Smad-indipendenti, che includono le vie di trasduzione ERK, JNK e p38/MAPK (147).e il legame BMPR-Smad attiva l'espressione di Distal-less homeobox (Dlx5), che a sua volta induce l'espressione di Runx2 e Osterix (Osx) nelle cellule osteoprogenitrici. Sebbene le proteine Smad siano regolatori critici nel segnale di TGF $\beta$ , la BMP-2 può anche attivare risposte Smad-indipendenti, che coinvolgono la via delle MAP chinasi (ERK, JNK e p38) e determinano la regolazione della fosfatasi alcalina e dell'osteocalcina negli osteoblasti (147).

### **Via del segnale di FGF**

I polipeptidi della famiglia FGF regolano l'ossificazione encondrale e membranosa attraverso quattro recettori tirosin-chinasici correlati (Fgfr1- Fgfr 4). Fgfr1 è espresso nei condrociti ipertrofici ed è implicato nella maturazione degli osteoblasti: esso stimola il differenziamento dei precursori ma arresta la maturazione degli osteoblasti differenziati. FGF2 9 e 18 interagiscono probabilmente con Fgfr1 espresso dagli osteoblasti. Negli osteoblasti differenziati, FGF2 attiva Runx2 attraverso la via MAPK e ha un ruolo dominante nella regolazione della mineralizzazione e della formazione di osso.

L'espressione di Fgfr2 è indotta nei condrociti quiescenti e inibita nei proliferanti. FGF18 è il ligando fisiologico di Fgfr3, che regola la crescita ed il differenziamento dei condrociti proliferanti e la densità e lo spessore corticale dell'osso (148).

### **Via del segnale di Notch**

Poiché i recettori Notch e i loro ligandi sono proteine transmembrana, la cascata di trasduzione del segnale viene attivata a seguito all'interazione cellula-cellula. Notch 1 e Notch 2 sono espressi dagli osteoblasti (149). Dati sperimentali sostengono la funzione dimorfica del segnale di Notch, che sembra in grado di regolare positivamente l'espressione dei geni del differenziamento osteoblastico ed indurre osteosclerosi, ma anche di reprimere la maturazione degli osteoblasti indotta dalla BMP, inibendo l'azione transattivatrice di Runx2 (150).



### **Via del segnale di MAPK**

Le MAPK sono proteine serina/treonina-chinasiche coinvolte in diversi meccanismi di regolazione cellulare. La via MAPK è attivata da diversi fattori di crescita implicati nell'osteogenesi, quali FGF, PDGF, TGF $\beta$  e IGF. Gli stimoli extracellulari determinano l'attivazione di una cascata di trasduzione del segnale composta da MAP chinasi, MAP chinasi chinasi (MAPKK) e MAP chinasi chinasi chinasi (MAPKKK) (151).

### ***Fattori di trascrizione (TF)***

I TF guidano il commissionamento tessuto-specifico delle MSC. Runx2, membro della famiglia dei fattori associati a Runt, è considerato l'interruttore osteoblastico, modulando l'attivazione temporale e/o la repressione dei geni essenziali dell'osteogenesi (152). Runx2 è ampiamente espresso nella cartilagine calcificata e nell'osso. Possiede un dominio di transattivazione, ricco in residui di glutamina e alanina, che attiva i promotori di osteocalcina e collagene di tipo 1 (COL1A1); la sua inattivazione determina l'inibizione dell'osteogenesi. Oltre ad essere espresso negli osteoprogenitori a uno stadio precoce del differenziamento, Runx2 è essenziale per la funzionalità degli osteoblasti. Molti TF coinvolti nella regolazione del differenziamento osteoblastico esercitano la loro funzione interagendo con Runx2, alcuni fornendo segnali costimolatori, altri reprimendo direttamente l'attività del TF mediante interazione col legame al DNA e la funzione di transattivazione.

La progressione del programma differenziativo delle cellule osteoprogenitrici vede implicati altri geni chiave, come Osterix, che codifica per un TF a valle di Runx2 (152). Osterix contiene tre domini zinc finger C2H2 responsabili del legame al DNA ed un dominio di transattivazione ricco in proline e serine che stabilisce l'attivazione dei geni osteocalcina e COL1A1. I precursori osteoblastici del periostio in cui Osx viene inattivato esprimono marcatori condrocitici come Sox9 e COL2A1; ciò suggerisce che i preosteoblasti che esprimono Runx2 siano ancora cellule bipotenziali e che Osx agisca a valle di Runx2 nell'indurre il differenziamento osteoblastico dell'osteocondroprogenitore.

## ***Ruolo dei fattori di crescita***

I fattori di crescita (GF) sono polipeptidi che modulano le funzioni cellulari in maniera autocrina, paracrina o endocrina (153). Un singolo GF può avere effetti su tipi cellulari diversi e indurre risposte differenti in base alla cellula sulla quale agisce; tuttavia una caratteristica fondamentale del sistema di segnalazione è la ridondanza, quindi un fattore di crescita può legare recettori differenti trasducendo il medesimo segnale. I GF più rilevanti nella biologia dell'osso sono BMP, TGF $\beta$ , FGF, PDGF, VEGF e IGF. Come descritto precedentemente, i GF vengono secreti durante le fasi della riparazione ossea dalle cellule del microambiente, come le cellule infiammatorie, i fibroblasti, le cellule endoteliali, le MSC e gli osteoblasti. Nella fase infiammatoria il contributo maggiore deriva dai GF contenuti negli  $\alpha$ -granuli delle piastrine (TGF $\beta$ , PDGF, VEGF e IGF), mentre i macrofagi e le altre cellule infiammatorie secernono FGF, PDGF e TGF $\beta$ . La migrazione degli osteoprogenitori è indotta da BMP, PDGF, FGF e VEGF, inoltre PDGF e FGF stimolano la proliferazione delle cellule del periostio (139).

La proliferazione e il differenziamento dei progenitori sono modulati da TGF, IGF, BMP6, BMP2 e BMP7, mentre VEGF e FGF2 regolano la crescita vascolare (139)

Le BMP (ad eccezione della BMP1) appartengono alla superfamiglia del TGF $\beta$ , sono immagazzinate nella ECM e vengono rilasciate principalmente da cellule osteoprogenitrici, osteoblasti e condrociti (154). Anche altre cellule possono secernere tali proteine, come le cellule endoteliali che esprimono BMP2 (155). Osteoblasti e condrociti maturi producono livelli significativi di BMP durante il processo di guarigione della frattura (155). Le BMP inducono la cascata di eventi che determina l'osteochondrogenesi e che coinvolge chemotassi, proliferazione, differenziamento, sintesi della matrice extracellulare ed angiogenesi. BMP2 e BMP4 sono espresse nelle fasi precoci del differenziamento delle cellule mesenchimali staminali e tramite la loro azione chemioattrattente, richiamano i precursori mesenchimali durante lo sviluppo osseo, il rimodellamento e la riparazione delle lesioni. VEGF coopera con BMP4 nel reclutare i precursori osteoblastici (155). BMP2, BMP6 e BMP9 promuovono il differenziamento delle cellule mesenchimali pluripotenti in cellule osteoprogenitrici, e BMP2, BMP4, BMP6, BMP7 e BMP9 inducono la maturazione terminale in osteoblasti. BMP2 determina la sovraespressione di Runx2 e Osterix nelle fasi precoci del

differenziamento (96), e l'aumento dell'espressione della fosfatasi alcalina (ALP) e dell'osteocalcina e la deposizione di calcio nelle fasi successive. La maggior parte delle BMP sono inoltre capaci di indurre il differenziamento degli osteoblasti in osteociti. BMP13 e BMP14 stimolano il differenziamento condrocitico (156). Inoltre le BMP sono in grado di stimolare la sintesi di altri GF quali IGF e VEGF e di indurre il rilascio di fattori che promuovono l'osteoclastogenesi (157).

Fino ad oggi sono state identificate cinque isoforme del TGF $\beta$  (TGF $\beta$ 1-TGF $\beta$ 5). Durante il processo di guarigione ossea, TGF ha un ruolo rilevante nella condrogenesi e nell'ossificazione encondrale (158). TGF $\beta$ 1 induce la sintesi di BMP nelle cellule osteoprogenitrici, recluta i progenitori osteoblastici, promuove il differenziamento e induce la produzione di matrice osteoide e di proteine extracellulari quali collagene, proteoglicani, osteopontina, osteonectina e ALP (159). TGF $\beta$ 1 è inoltre un importante fattore di accoppiamento tra osteoblasti ed osteoclasti (160): da un lato favorisce il reclutamento dei precursori ematopoietici degli osteoclasti, dall'altro ha un effetto inibitorio sul riassorbimento osseo e stimola la produzione di osteoprotegerina.

Gli FGF stimolano la proliferazione di osteoblasti, condrociti, miociti e cellule endoteliali. FGF1 e FGF2 sono i fattori maggiormente implicati nel processo di guarigione ossea. Il primo ha un ruolo rilevante nella maturazione dei condrociti (161); il secondo è sintetizzato dagli osteoblasti, viene immagazzinato nella ECM e stimola la proliferazione cellulare e il differenziamento osteoblastico. FGF2 induce Runx2 (102) e osteocalcina (162) e favorisce la formazione di noduli minerali (163); inibisce l'apoptosi degli osteoblasti immaturi, mentre stimola l'apoptosi degli osteociti (164); regola l'osteoclastogenesi in maniera indiretta, tramite meccanismi mediati dagli osteoblasti, ed in maniera diretta, agendo sui pathway di RANKL, ciclossigenasi-2 e p42/p44 MAPK (165).

Durante le fasi precoci della guarigione della frattura il PDGF è rilasciato dagli  $\alpha$ -granuli delle piastrine (166), mentre in seguito viene secreto dalle cellule presenti nel sito di riparazione, e agisce in un primo momento sulla proliferazione ed in seguito sul differenziamento degli osteoprogenitori.

Il VEGF è prodotto dalle cellule endoteliali e dagli osteoblasti e durante le fasi precoci della rigenerazione ossea, è rilasciato anche dagli  $\alpha$ -granuli piastrinici. Sebbene l'induzione dell'angiogenesi sia l'effetto più noto del VEGF, esso ha un ruolo peculiare

nella proliferazione e differenziamento delle cellule ossee (167). È coinvolto nella trasformazione della cartilagine in callo osseo durante la fase riparativa (168) determina un incremento del numero degli osteoblasti. VEGF inoltre favorisce l'osteoclastogenesi inducendo l'espressione di RANK nei precursori osteoclastici (169). IGF-I è prodotto principalmente dagli epatociti in risposta all'ormone della crescita, ma viene anche sintetizzato da cellule endoteliali, osteoblasti e condrociti e viene immagazzinato nella matrice cellulare. Sebbene IGF-II sia più abbondante nel tessuto osseo rispetto a IGF-I, quest'ultimo ha un effetto più potente e la sua presenza è stata rilevata in fratture in fase di guarigione (170). Nelle prime fasi della riparazione ossea IGF-I stimola la proliferazione cellulare e promuove la formazione di matrice ossea da parte di osteoblasti differenziati (171). IGF-II agisce negli stadi tardivi dell'ossificazione endondrale, stimola la produzione di collagene di tipo I, la sintesi di matrice cartilaginea e la proliferazione cellulare (172). IGF ha un ruolo rilevante nell'equilibrio tra formazione e riassorbimento osseo (173).

## ***Ruolo del microambiente extracellulare***

### **Tensione di ossigeno**

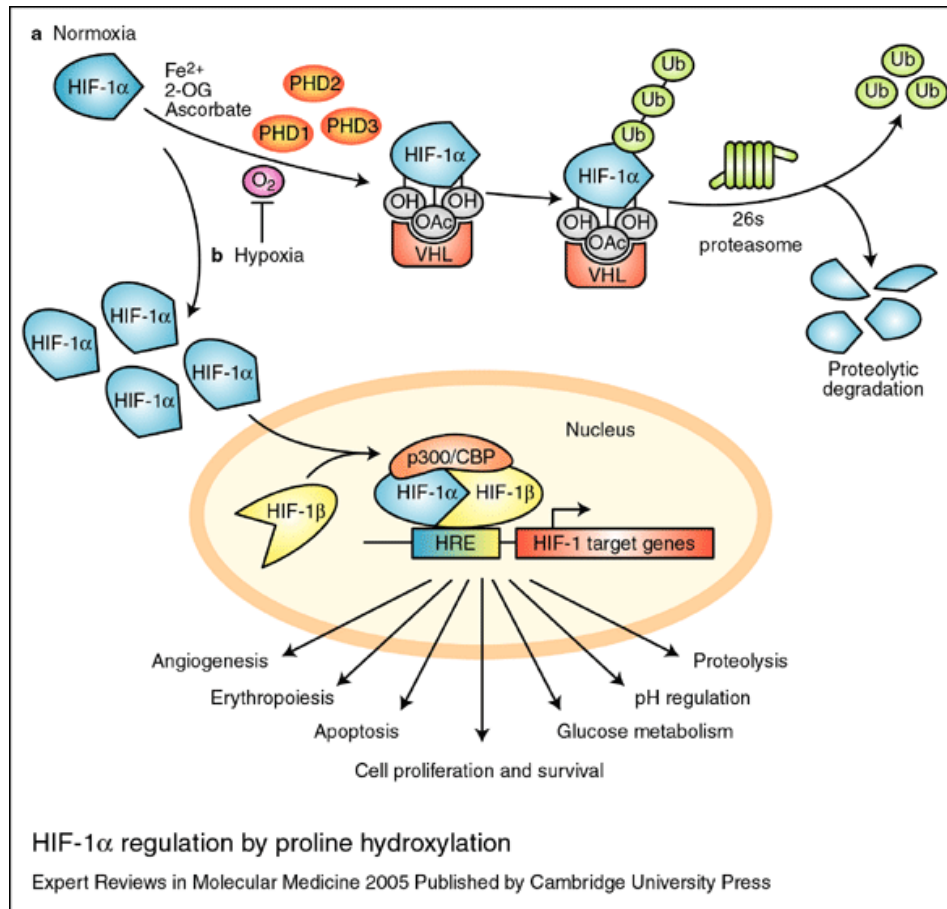
Dati recenti hanno dimostrato come condizioni sperimentali non convenzionali che simulano il microambiente in cui le cellule saranno trapiantate possano, di fatto, essere più idonee a valutare il loro potenziale differenziativo.

Recentemente è stato dimostrato che l'ipossia è un'importante caratteristica del microambiente cellulare capace di modulare il comportamento dei diversi tipi di cellule staminali, quali le cellule staminali embrionali (174), le cellule IPs (175) e le cellule staminali adulte (176).

La nicchia delle cellule staminali è definita come un compartimento anatomico costituito da componenti cellulari e acellulari che integrano i segnali locali e sistemici per regolare la biologia delle cellule staminali (177). Le cellule, i vasi sanguigni, le glicoproteine della matrice e lo spazio tridimensionale che si forma da questa architettura fornisce un microambiente altamente specializzato per le cellule staminali (178). Le cellule staminali sono convenzionalmente mantenute in coltura con tensione di ossigeno pari quella dell'ambiente, prestando poca attenzione al microambiente metabolico della nicchia in cui le cellule staminali crescono o risiedono normalmente. Studi recenti hanno riportato che basse tensioni di ossigeno influenzano positivamente sia le cellule staminali embrionali che quelle adulte (179-181).

Nei tessuti adulti la tensione di ossigeno è considerevolmente differente quella presente nell'atmosfera inalata, pari al 21% (160 mm Hg). La pressione parziale di ossigeno ( $pO_2$ ) dell'aria inspirata diminuisce progressivamente dopo l'ingresso nei polmoni e nel circolo sanguigno. Quando raggiunge gli organi e i tessuti, i livelli di  $pO_2$  scendono fino al 2-9% (14-65 mm Hg) (182-183). Tale pressione è drasticamente differente dalla tensione di ossigeno dell'aria tipicamente considerata "normossica" secondo gli standard convenzionali delle colture cellulari. Un evento chiave nell'adattamento cellulare al microambiente ipossico è l'induzione del fattore di trascrizione *hypoxia-inducible factor* (HIF)-1, composto da una subunità  $\alpha$  ossigeno-sensibile e una subunità  $\beta$  costitutivamente espressa. In presenza di alti livelli di ossigeno (>9%), HIF-1 $\alpha$  è soggetto alla degradazione proteasoma-dipendente. In

condizioni ipossiche, HIF-1 $\alpha$  si stabilizza, dimerizza con HIF-1 $\beta$  e induce vari geni implicati nei processi di adattamento all'ipossia, come la glicolisi, l'eritropoiesi e l'angiogenesi (184).



**Figura 8.** Via di HIF-1 $\alpha$ . In normossia la subunità HIF-1 $\alpha$  è soggetta a degradazione proteosomale; in ipossia HIF-1 $\alpha$  si dimerizza con HIF-1 $\beta$  e transattiva geni implicati in diversi processi cellulari.

(Fonte: [http://journals.cambridge.org/fulltext\\_content/ERM/ERM7\\_06/S1462399405009117sup010.g](http://journals.cambridge.org/fulltext_content/ERM/ERM7_06/S1462399405009117sup010.g))

I diversi tessuti da cui tali cellule staminali sono state isolate hanno bassa tensione di ossigeno (185-187).

Sono stati eseguiti studi per analizzare gli effetti dell'ipossia sulle MSC, con risultati spesso contrastanti. Per esempio, alcuni studi dimostrano che le MSC isolate da midollo osseo in ipossia hanno una diminuita capacità di differenziarsi in adipociti ed osteoblasti, a supporto della teoria che basse tensioni di ossigeno promuovono uno stato indifferenziato delle MSC (188-190). Diversamente, altri studi riportano che le MSC espansive in condizioni ipossiche hanno una migliore capacità differenziativa verso la linea condrogenica (191-192). Inoltre, recentemente è stato dimostrato che

condizioni ipossiche di coltura promuovono il differenziamento condrogenico, osteogenico e adipogenico e le cellule mantenute in ipossia mostrano un'incrementata capacità di riparazione ossea *in vivo* (193).

In sintesi, sebbene le i risultatisperimentali siano altamente variabili per le diverse condizioni sperimentali e i campioni usati (MSC isolate da diverse fonti), è chiaro che l'ipossia influenza il differenziamento delle MSC.

La tensione di ossigeno fisiologica del tessuto adiposo è tipicamente <3%, perciò le ASC risiedono in siti anatomici relativamente ossigeno-deficitarie (194). Coltivando *in vitro* le ASC in condizioni ipossiche se ne può migliorare l'espansione, il differenziamento, l'adesione, la secrezione di fattori di crescita e il potenziale rigenerativo (195). Studi recenti hanno analizzato gli effetti di una ridotta tensione di ossigeno sulle ASC, con risultati contrastanti. Bassi livelli di ossigeno sembrano ridurre il differenziamento condrogenico e osteogenico delle ASC murine (193) e il differenziamento adipogenico e osteogenico delle ASC umane (196), mentre l'ipossia moderata (5% O<sub>2</sub>) ha mostrato bassi tassi di proliferazione, ma un migliorato potenziale condrogenico ed osteogenico delle ASC umane (197-199).

## **Il pH extracellulare**

Ulteriore caratteristica, meno studiata, del microambiente cellulare, in grado di modulare il comportamento delle cellule staminali, è il pH extracellulare. In condizioni fisiologiche, il pH del sangue periferico è pari a circa 7.4-7.35, mentre il pH dei fluidi che circondano le cellule nei tessuti è più basso e soggetto a gradienti che derivano dal metabolismo cellulare.

A livello fisiologico esistono sistemi tampone che permettono di mantenere l'omeostasi acido-base. Un sistema tampone è costituito da un acido debole e una base forte in grado di contrastare le forti variazioni di pH dovute all'aggiunta di un acido o di una base. Il più importante tampone fisiologico è il sistema acido carbonico/bicarbonato. L'acido carbonico, l'acido debole, e il bicarbonato, la base coniugata, sono in equilibrio con gli ioni idrogeno. Essenzialmente nel corpo umano tutto l'acido carbonico esiste sotto forma di anidride carbonica, pertanto l'anidride carbonica è la forma acida del tampone acido carbonico/bicarbonato. L'equazione di Handerson-Hasselbach per il sistema tampone acido carbonico/bicarbonato descrive la relazione matematica tra il pH, la concentrazione di bicarbonato in milliequivalenti per

litro, e la pressione parziale ( $p\text{CO}_2$ ) del biossido di carbonio in mm Hg:  $\text{pH} = \text{pK}_a + \log \left( \frac{\text{HCO}_3^-}{0,03 \times p\text{CO}_2} \right)$  (200). L'equazione di Handerson-Hasselbach dimostra che solo il rapporto tra l'acido e la base coniugata e non i loro valori assoluti determinano il pH. Tuttavia l'omeostasi acido-base può non essere sbilanciata, portando allo sviluppo di una condizione di acidosi o alcalosi (200).

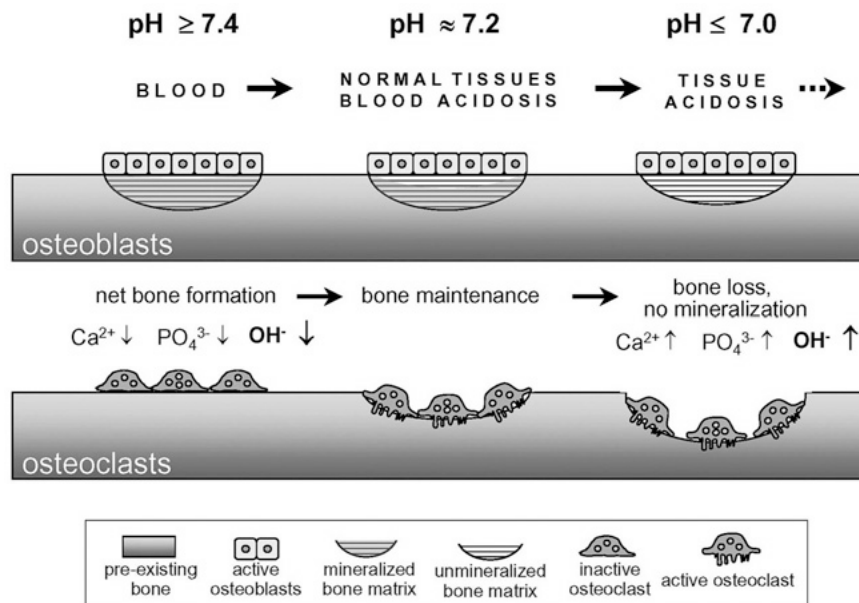
L'acidosi extracellulare è causata da un aumentato metabolismo glicolitico e dalla produzione di acido carbonico e lattico, i quali sono estrusi dalla cellula per mantenere il pH intracellulare vicino i valori di neutralità. In seguito, si sviluppa un gradiente di membrana opposto: il pH extracellulare ( $\text{pH}_e$ ) dei tessuti danneggiati è inferiore al pH intracellulare ( $\text{pH}_i$ ). Tuttavia il pH nei tessuti lesionati è circa 0.5-0.8 unità inferiore ai tessuti normali (201).

Oltre che alle malattie renali e respiratorie, ci sono molte altre cause di acidosi sistemica. Queste includono l'esercizio anaerobico, l'eccessivo consumo di proteine e di altre sostanze acidificanti, il diabete, l'anemia, l'AIDS e l'invecchiamento (202). L'acidosi locale può portare all'attivazione di citochine e fattori di crescita implicati nel metabolismo cellulare, ischemia, infiammazione, infezione, tumori, guarigione e fratture ossee (203). L'omeostasi acido-base e la regolazione del pH sono critici sia per la normale fisiologia che per le funzioni cellulari e metaboliche (203). Generalmente lo stato di acidosi metabolica è caratterizzato da un pH del sangue periferico inferiore a 7.35 (201).

I valori di pH dei fluidi interstiziali tipici delle malattie infiammatorie (204) e dei tumori solidi vanno da pH 6.0 a pH 7.0 (205). Tuttavia anche le fratture ossee sono correlate all'interruzione della vascolarizzazione, portando ad uno stato di ipossia con un cambiamento del metabolismo cellulare verso la glicolisi anaerobia associata all'accumulo di acido lattico. Pertanto, nelle prime fasi della frattura si può sviluppare acidosi extracellulare (206-207).



È noto che l'osso è in grado di tamponare l'acidosi primariamente tramite il rilascio fisico-chimico dei minerali alcalini ossei, dunque lo scheletro funge da scambiatore di ioni. Le variazioni del pH dei fluidi extracellulari del microambiente possono influenzare il processo di formazione ossea e di mineralizzazione: l'acidosi inibisce la deposizione della matrice minerale da parte degli osteoblasti; diversamente essa promuove il riassorbimento osseo da parte degli osteoclasti (209-210).



**Figura 9.** Effetto del pH extracellulare sul rimodellamento osseo. La mineralizzazione della matrice è fortemente inibita a pH <7. All'opposto, l'acidosi extracellulare induce gli osteoclasti a formare le lacune di riassorbimento. (Fonte: Arnett TR. *Extracellular pH regulates bone cell function. J Nutr.* 2008 Feb;138(2):415S-418S).

### ***Limiti della terapia cellulare in ortopedia***

Le MSC rappresentano una base ormai consolidata per le applicazioni di terapia cellulare ed ingegneria tissutale per la rigenerazione e la riparazione ossea. In tutti i casi in cui l'omeostasi ossea, e quindi la capacità riparativa, risulti compromessa (malattie genetiche e degenerative, traumi, pseudartrosi, fratture e necrosi avascolare) è possibile trarre vantaggio dalla terapia cellulare. Le MSC, ovvero i progenitori ossei, possono essere trapiantati nel sito della lesione sia da soli che in combinazione con scaffold biologici o artificiali (211).

Il midollo osseo autologo è ricco di fattori di crescita e di osteoprogenitori (212).

La frazione cellulare mononucleata del midollo osseo può essere utilizzata direttamente tramite infusione dell'aspirato midollare nel sito di lesione. Per aumentare il numero delle cellule mononucleate è possibile separare la frazione mononucleata e concentrarla da 3 a 6 volte. Il tasso di rigenerazione aumenta in proporzione al numero delle cellule infuse (212).

Prima del reimpianto, le cellule mononucleate, concentrate o non, possono essere combinate in sala operatoria con matrici osteoinduttive sintetiche o naturali. I vantaggi dell'approccio *one-step* (espianto e reimpianto nella stessa seduta operatoria) riguardano principalmente il paziente che viene sottoposto una sola volta all'intervento con anestesia; inoltre si evitano i rischi di contaminazione dovuti alla manipolazione del materiale espantato. Dal punto di vista biologico, mantenendo intatto il pool di cellule mononucleate, non si eliminano componenti cellulari accessorie che potrebbero avere un ruolo importante nel favorire l'attecchimento degli osteoprogenitori (11-12). Tuttavia, la quantità di MSC nel midollo osseo è  $< 0.01\%$  e questo può essere un limite nel caso in cui la terapia cellulare sia applicata per la riparazione di difetti ossei critici ( $>3$  cm). In questi casi può essere consigliabile utilizzare tecniche di espansione cellulare *ex vivo*.

L'ingegneria tissutale combina l'aspirato midollare o le MSC precedentemente espanse *in vitro* con scaffold sintetici o molecole segnale (fattori di crescita o fattori differenzianti) per formare costrutti ibridi.

I biomateriali utilizzati in ingegneria tissutale riproducono la matrice extracellulare ossea (idrossiapatite, collagene di tipo I), ma, di fatto, costituiscono un microambiente

artificiale, che deve essere riconosciuto dalle cellule del paziente, colonizzato e vascolarizzato per promuovere la rigenerazione del tessuto osseo e la guarigione. La formazione ossea richiede che differenti popolazioni cellulari cooperino mediante segnali biochimici per creare un tessuto complesso e tridimensionale adeguatamente vascolarizzato (212). In questo contesto le caratteristiche intrinseche del donatore (età, diversità genetica, malattia di base) sembrano determinanti nel condizionare la qualità finale dei costrutti. L'approccio autologo per l'isolamento e l'espansione delle MSC è molto dispendioso in termini logistici, produttivi e di sicurezza delle condizioni di coltura. Sono necessari miglioramenti tecnici (cellule, dose, tempo), normativi (regolamentazione per la produzione dei costrutti) e soprattutto studi clinici per stabilire l'efficacia delle tecniche di ingegneria tissutale.

L'utilizzo di cellule staminali espanse *ex vivo* per il trattamento di malattie umane suscita ancora diverse preoccupazioni. Alcuni dei problemi correlati alle MSC trapiantate sono la reazione immunomediata, l'instabilità genomica o la perdita di funzione, e la limitata sopravvivenza cellulare.

Per ottenere una quantità di MSC idonea a garantire un'efficace riparazione ossea vengono adottate tecniche di espansione *ex vivo*. La senescenza replicativa, determinata dal mantenere in coltura le MSC per molti passaggi, così come la perdita della multipotenza, responsabile del commissionamento delle cellule, rappresentano le principali ragioni che limitano l'espansione delle MSC in coltura prima del trapianto (213). Oltre a questi problemi, l'ostacolo maggiore nell'utilizzo delle MSC per le applicazioni cliniche è la possibilità di trasformazione spontanea delle cellule (214). L'esatto meccanismo della trasformazione delle MSC non è completamente chiarito, ma sembrano implicati l'up-regolazione di c-myc, la repressione di p-16 e l'aumento dell'attività telomerasica. Inoltre, la manipolazione genica delle MSC per il trattamento delle diverse malattie può di per se aumentare il potenziale oncogeno delle cellule. MSC sono state trovate in numerosi tumori, come l'adenocarcinoma gastrico (215), il lipoma (216) e l'osteosarcoma (214), suggerendo il loro possibile coinvolgimento nello sviluppo di tumori. Molti studi indicano che i progenitori mesenchimali sono una fonte di "cancer associated fibroblasts" (CAF) (217). La principale caratteristica dei CAF è di interagire attivamente con le cellule neoplastiche di tumori stromali e secernere fattori di crescita, quali TGF $\beta$ , FGF e PDGF.

Alla luce di queste osservazioni, la scelta di una strategia terapeutica rigenerativa basata sull'impiego di MSC autologhe dovrebbe considerare l'interazione tra le cellule staminali adulte e sito in cui esse vengono trapiantate, considerando da un lato la fonte di MSC e dall'altro le caratteristiche del microambiente ospite. Il risultato di questa interazione deve essere attentamente esaminato per ottenere un effettivo risultato terapeutico e per escludere rischi per la salute umana.

# EFFETTO DELL'IP OSSIA SULLA STAMINALITÀ E IL DIFFERENZIAMENTO OSTEOGENICO DI CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI DA TESSUTO ADIPOSO (ASC)

## **Obiettivo**

Per molto tempo, il midollo osseo è stato considerato la fonte più appropriata per l'isolamento delle MSC (53). Tuttavia, numerosi studi hanno dimostrato che vi sono altri tessuti da cui è possibile isolare queste cellule. La distribuzione ubiquitaria e una procedura chirurgica minimamente invasiva fanno del tessuto adiposo una fonte ideale per l'isolamento di notevoli quantità di MSC. Molti studi *in vitro* e *in vivo* suggeriscono che l'utilizzo di ASC migliori il processo di guarigione ossea, sia direttamente, poiché esse possono differenziarsi in osteoblasti, sia indirettamente, tramite effetti paracrini che stimolano la migrazione e il differenziamento dei precursori osteogenici residenti (218-219). Le ASC possiedono un'elevata capacità proliferativa e sono geneticamente stabili nelle colture cellulari a lungo termine (68)

Dati recenti hanno dimostrato come le condizioni di coltura *in vitro* non sono realmente rappresentative del microambiente in cui le MSC saranno trapiantate e dunque non sono del tutto idonee a valutarne il potenziale differenziativo. In particolare, per le MSC la bassa tensione di ossigeno deve essere considerata la condizione fisiologica, altrimenti detta "normossia fisiologica", rispetto al 21% della tensione di ossigeno dell'aria che è comunemente usata nelle condizioni standard di coltura (74). L'ipossia modula lo sviluppo embrionale, mantiene la pluripotenza delle cellule staminali, induce il differenziamento e regola diversi processi biologici, inclusa l'angiogenesi (220).

Scopo di questo studio è stato quello di valutare *in vitro* l'influenza dell'ipossia prolungata sul potenziale osteogenico delle ASC isolate da tessuto adiposo intatto. È stato scelto un metodo che mimasse al meglio ciò che accade agli osteoprogenitori quando sono trapiantati nel microambiente ipossico. Sono state esaminate le variazioni dell'immunofenotipo, l'espressione genica, i marcatori biochimici, la

produzione di matrice minerale ed il rilascio dei fattori di crescita da parte delle ASC continuamente mantenute in ipossia (2-3% O<sub>2</sub>) o in condizioni di normossia (21% O<sub>2</sub>), in presenza o in assenza di stimoli osteogenici (questa parte del progetto è tratta da : Fotia C, Massa A, Boriani F, Baldini N, Granchi D. Prolonged exposure to hypoxic milieu improves the osteogenic potential of adipose derived stem cells. J Cell Biochem. 2015 Jul;116(7):1442-53).

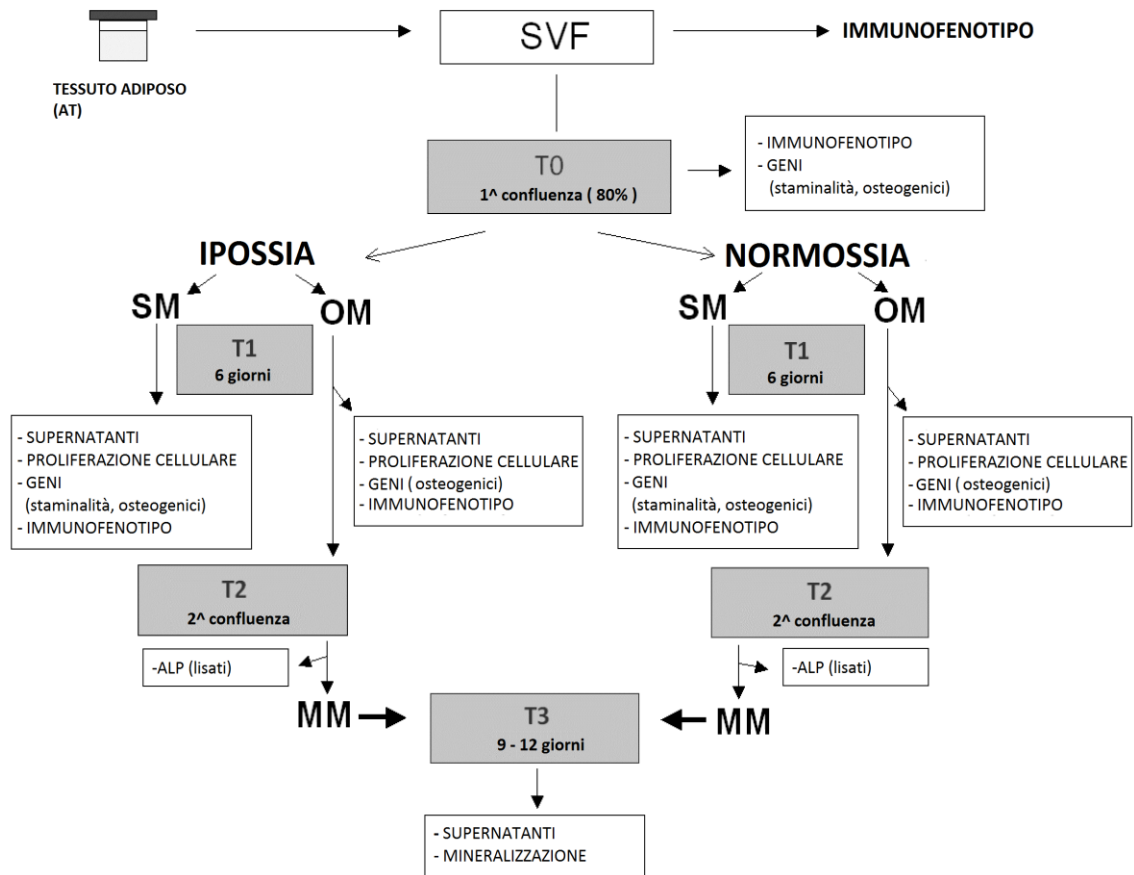
## MATERIALE E METODO

### ***Colture cellulari***

Le ASC sono state isolate dal tessuto adiposo intatto di 6 soggetti (5 femmine, età media 42,6 anni; un maschio, età 37 anni) sottoposti ad addominoplastica in seguito ad una notevole perdita di peso (BMI < 30). Il consenso informato è stato ottenuto dai pazienti arruolati, che hanno acconsentito all'utilizzo di materiale di scarto per scopi di ricerca. Ad ogni campione è stato assegnato un codice numerico per assicurare l'anonimato. Tutti i campioni sono stati processati entro 24 ore.

Il tessuto adiposo è stato lavato con PBS, tagliato in piccoli pezzi e incubato con collagenasi di tipo II allo 0,075% (Gibco, Invitrogen, Monza, Italy) in agitazione continua per 60 minuti a 37°C. Gli adipociti maturi e il tessuto connettivo sono stati separati tramite centrifugazione e filtrazione a 100 µm. La SVF appena isolata è stata risospesa in terreno di coltura standard (SM), ovvero in  $\alpha$ -MEM (Sigma-Aldrich, Milan, Italy) addizionato con il 10% di FBS, 100 U/ml di penicillina, 0.1 mg/ml di streptomina e 0.25 µg/ml di Fungizone (Gibco). Le cellule sono state seminate e mantenute a 37°C, 5% di CO<sub>2</sub> e 21% O<sub>2</sub> in atmosfera umidificata. Dopo 96-120 ore le cellule raggiungevano circa l'80% della confluenza. A questo tempo, le ASC sono state seminate per i vari esperimenti nelle due condizioni di tensione di ossigeno. Per simulare le condizioni ipossiche le cellule sono state incubate nella camera ipossica *Hypoxia Incubator Chamber* (Stem Cell Technology, Vancouver, Canada) insufflata con una miscela di gas (95% N<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>). La tensione finale di ossigeno era 2-3% misurata tramite l'ossimetro *Oxybaby M+* (Witt Technology, Solza, Italia). Il terreno di coltura è stato sostituito ogni 3-4 giorni. Per il differenziamento osteogenico, il terreno differenziante (OM) consisteva in  $\alpha$ -MEM addizionato di con 50 µg/ml di acido L-ascorbico 2-fosfato e desametasone 10<sup>-8</sup> M (Sigma). Il terreno mineralizzante (MM) era l'OM supplementato con il  $\beta$ -glicerofosfato 10mM (Sigma). L'effetto dell'ipossia è stato valutato analizzando differenti parametri (immunofenotipo, espressione genica, proliferazione cellulare, rilascio dei fattori di crescita, attività della ALP e deposizione di noduli minerali) a differenti tempi, come segue: T0, selezione per adesione delle ASC dopo 96-120 ore dalla semina della SVF, prima della condizione di ipossia; T1, dopo 6 giorni di coltura

con SM o OM; T2, solo in condizione di OM sulle cellule confluenti; T3, sulle cellule coltivate per 9-12 gg con MM. Il protocollo per la caratterizzazione della coltura cellulare è riassunto nella figura 10.



**Figura 10.** Diagramma a flusso per la valutazione degli effetti dell’ipossia sullo stato di staminalità e sul differenziamento osteogenico delle ASC umane. Le ASC sono state isolate dalla SVF tramite l’adesione, dopo 96-120 ore dalla semina. T#: tempi; SM, medium standard; OM, medium osteogenico; ALP, fosfatasi alcalina; MM, medium mineralizzante. I geni di staminalità analizzati erano *NANOG*, *SOX2* e *OCT4*. I geni analizzati del differenziamento osteogenico erano *COL1A1*, *COL12A1*, *ISBP*, *SPARC*, *POSTN*, *CLEC3B*, *BGLAP*, e *ALPL*. I supernatanti sono stati utilizzati per i saggi ELISA per quantificare il rilascio dei fattori di crescita, quali bFGF, PDGF-BB e TGFβ.



### ***Citofluorimetria a flusso***

L'immunofenotipo delle ASC è stato analizzato tramite anticorpi monoclonali coniugati con fluorescina isotiocinato (FITC), o R-ficoeritrina (RD1) o RD1-cianina (PC5) (Biolegend, Milano, Italia). La descrizione degli antigeni analizzati è mostrata nella tabella 2.

Gli anticorpi monoclonali e le cellule ( $10^5$ /test) sono stati incubati per 20 minuti a 4°C; la percentuale delle cellule positive è stata valutata su 10.000 eventi usando il citometro a flusso EPICS XL-MCL (Beckman Coulter, Fullerton, CA). Per gli antigeni altamente espressi (>95%) abbiamo valutato l'intensità media di fluorescenza (MFI), che indica l'espressione media degli antigeni sulla superficie delle cellule.

### ***Proliferazione cellulare***

Le ASC sono state seminate 100.000/pozzetto in duplicato in piastra da sei pozzetti. In accordo con la cinetica del nostro modello cellulare (215), la proliferazione cellulare è stata saggiata dopo 6 giorni di coltura in ipossia o normossia. Le cellule sono state staccate con tripsina-EDTA 0.05% (Gibco) e la conta cellulare è stata effettuata tramite eritrosina B (Sigma), colorante di esclusione per le cellule non vitali.

### ***Analisi dell'espressione genica***

L'espressione genica è stata analizzata in duplicato al T0 e al T1 tramite la quantificazione del trascritto dei geni correlati alla staminalità (217) e al potenziale osteogenico (218) delle ASC (Tabella 1). L'RNA è stato estratto con il kit NucleoSpin RNAII (Macherey-Nagel, Düren, Germania), seguendo il protocollo di estrazione specifico per le cellule animali. L'eluizione finale è stata effettuata utilizzando 30 µl di H<sub>2</sub>O DEPC (dietilpolicarbonato). La concentrazione di RNA è stata determinata mediante la lettura allo spettrofotometro a 260 nm e 280 nm. Una ratio A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> fra 1.7 e 2.0 depone per un RNA sufficientemente puro.

La trascrizione inversa di RNA totale è stata eseguita utilizzando il Gene Amp RNA PCR Core Kit (Applied biosystems, Foster City, CA). Ad una quantità di RNA totale pari ad 1 µg sono stati aggiunti MgCl<sub>2</sub> 5mM, PCR Buffer 1x, dGTP, dATP, dTTP e dCTP 1mM,

Oligo dT 2.5  $\mu$ M, Rnase Inhibitor 1U/ $\mu$ l e MuLV Reverse Transcriptase 2.5 U/ $\mu$ l, per un volume finale di 20  $\mu$ l. Il campione è stato sottoposto a fasi successive di incubazione: a temperatura ambiente per 10', a 42°C per 15', a 99°C per 5' ed a 4°C per 5' tramite i termociclatore (I Cycler, Biorad, Milano, Italia). Ogni cDNA ottenuto è stato analizzato mediante lettura spettrofotometrica alle lunghezze d'onda di 260 e 280 nm al fine di determinare sia la concentrazione che la qualità. Il valore indicativo di una buona qualità del cDNA è un rapporto A260/A280 pari a 1.8. i campioni sono stati conservati a -20°C fino al momento dell'utilizzo.

La Real time PCR è stata eseguita mediante l'utilizzo dello strumento Light Cycler e il sistema Universal Probe Library (Roche Applied Science, Monza, Italia). I primers e le sonde per ogni saggio sono state selezionate utilizzando un software reperibile in rete chiamato Probe Finder (<https://www.roche-appliedscience.com/sis/rtpcr/upl/index.jsp?id=UP020301>), mentre il saggio migliore per ciascun gene è stato confermato utilizzando Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Tabella 1). Ciascun cDNA (1  $\mu$ g) è stato amplificato e il corrispondente ciclo soglia è stato riferito ad una curva standard. Il gene housekeeping,  $\beta$ -actina, è stato usato come riferimento per normalizzare i dati della Real time PCR, i quali sono espressi come ratio di cDNA analizzato e cDNA di riferimento.

<b>GENE</b>	<b>NUMERO ID</b>	<b>PRIMER (5'-3')</b>	<b>SONDA<sup>a</sup></b>
<b>ALPL: fosfatasi alcalina, fegato/osso/rene</b>	NM_000478.3	gggtcagctccaccacaa gcattgggtgtgtacgtcttg	#52
<b>BGLAP: bone gamma-carboxyglutamate (gla) protein (osteocalcina)</b>	NM_199173.2	ggcgctacctgtactaatgg tcagccaactcgtcacagtc	#1
<b>CLEC3B: C-type lectin domain family 3, member B (tetranelectina)</b>	NM_003278.1	cctcaaggagccgtctggaca gtccccttcaggcagacc	#10
<b>COL1A1: collagene, tipo I, alpha I</b>	NM_000088.3	cccttgaaagaatggagat aatcctcgagcacctga	#60
<b>COL12A1: collagene, tipo XII, alpha I</b>	NM_004370.5	actggaaaagacgggtgcaat ccacttggctcttgactcc	#81
<b>ISBP: integrin binding sialoprotein (sialoproteina ossea)</b>	NM_004967.2	gcaagaaaatggagatgacagtt cttcattgttttctccttcattg	#35
<b>NANOG: Nanog homeobox</b>	NM_024865.2	atgcctcacacggagactgt agggtgtcctgaataagca	#69
<b>OCT-4: POU homeobox 1 classe 5, trascritto variante 1</b>	NM_002701.4	cttcgcaagccctcatttc gagaagggaaatccgaag	#60
<b>POSTN: periostin, osteoblast specific factor (periostina)</b>	NM_006475.1	atgggagacaaagtggcttc ctgctcctcccataatagactca	#47
<b>SOX-2: SRY (sex determining region Y)-box 2</b>	NM_003106.3	gggaatggaccttgatag gcaaagctcctaccgtacca	#65
<b>SPARC: secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectina)</b>	NM_003118.2	accgcttttcgagacc caagatccttgcgatccttct	#85
<b>B-ACTINA (gene housekeeping)</b>	NM_001101.2	ccaaccgagagaagatga agggtgtcctgaataagca	#65

**Tabella 1.** Espressione genica nelle ASC. Lista dei primers e delle sonde per analizzare i geni di staminalità e del fenotipo osteogenico. <sup>a</sup> Numero della sonda per ogni analisi di espressione genica (ProbeFinder: <http://www.roche-applied-science.com>).

### ***Attività biochimica dell'ALP***

L'attività della ALP è stata misurata con un metodo biochimico basato sulla conversione del p-ittrophenyl Phosphate Liquid Substrate (Sigma-Aldrich) in p-nitrofenolo. Le cellule sono state lisate con SDS allo 0,01% ed il substrato della reazione (p-nitrofenilfosfato) è stato aggiunto in proporzione 1:1 ai lisati cellulari. Dopo un'incubazione di 15 minuti a 37°C, è stata effettuata la lettura spettrofotometrica dei campioni a 405 nm, utilizzando uno spettrofotometro per micropiastre (Infinite F200pro, Tecan, Männedorf, Svizzera). L'attività della ALP è stata calcolata per interpolazione dei valori di assorbanza su una curva standard costituita da diluizioni seriali di una soluzione di p-nitrofenolo (range di concentrazione 0-40 mmoli). I risultati sono stati espressi come nmoli di p-nitrofenolo formato in 1 min e normalizzati per la quantità totale di proteine (BCA Protein Assay kit, Pierce, Rockford, IL). L'analisi citochimica della ALP è stata effettuata sulle cellule utilizzando un kit commerciale (Sigma-Aldrich).

### ***Saggio di mineralizzazione***

La deposizione della matrice minerale è stata valutata in duplicato sulle ASC coltivate con l'OM fino al raggiungimento della confluenza; in seguito è stato aggiunto  $\beta$ -glicerofosfato (10mM). Al tempo T3 è stata effettuata la colorazione con rosso di alizarina: le cellule sono state fissate con paraformaldeide al 3.7% in PBS per 20 minuti, incubate con rosso di alizarina 40mM a pH 4.2 per un'ora a temperatura ambiente e successivamente, lavate con H<sub>2</sub>O e osservate al microscopio ottico. La colorazione evidenzia in rosso i noduli minerali, poiché il colorante si lega ai precipitati di calcio.

### ***Saggi immunoenzimatici***

La concentrazione del bFGF, del PDGF-BB e del TGF $\beta$ 1 rilasciati nel sovrinatante dalle ASC è stata quantificata tramite kit commerciali, basati sul metodo immunoenzimatico ELISA diretto (human FGF DuoSet; human PDGF-BB DuoSet; human TGF $\beta$ 1, R&D System, Minneapolis, MN) seguendo il protocollo del kit. Per ogni saggio è stata allestita una curva standard di riferimento, usando l'appropriato fattore di crescita ricombinante umano, da 0 a 1000 pg/ml per il bFGF e da 0 a 2000 pg/ml per il PDGF-BB e TGF  $\beta$ 1. Brevemente, 100  $\mu$ l dello standard e del campione sono stati incubati nella micropiastra da 96 pozzetti precedentemente "coated" con l'anticorpo murino anti-umano, e un anticorpo murino biotinilato anti-umano è stato utilizzato per rilevare il fattore di crescita legato all'anticorpo immobilizzato. Per analizzare il contenuto di bFGF e PDGF-BB, il sovrinatante è stato utilizzato intatto, mentre per il TGF $\beta$ 1 il sovrinatante è stato attivato con l'HCl 1 N per 10 minuti a temperatura ambiente, successivamente la reazione è stata bloccata con l'NaOH/0.5 M HEPES. In seguito è stato effettuato un lavaggio per rimuovere legami enzima-anticorpo aspecifici, ed è stato aggiunto in ogni pozzetto una soluzione substrato di tetrametilbenzidina. La reazione è stata bloccata con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N e la densità ottica è stata letta tramite un lettore di micropiastre alla lunghezza d'onda di 450 nm (Infinite F200pro, Tecan). Le concentrazioni dei fattori di crescita sono state estrapolate tramite un software dedicato, Magellan V 7.1 SP-1 (Tecan).

### ***Analisi statistica***

L'analisi statistica è stata eseguita tramite il software StatView 5.01 (SAS Institute, Inc., Cary, NC). I risultati quantitativi sono stati espressi come media aritmetica più o meno l'errore standard della media (SEM). Il test Mann-Whitney è stato eseguito per la comparazione di due variabili indipendenti. Tutti i valori di  $p$  inferiori a 0,05 sono stati considerati statisticamente significativi.

## RISULTATI

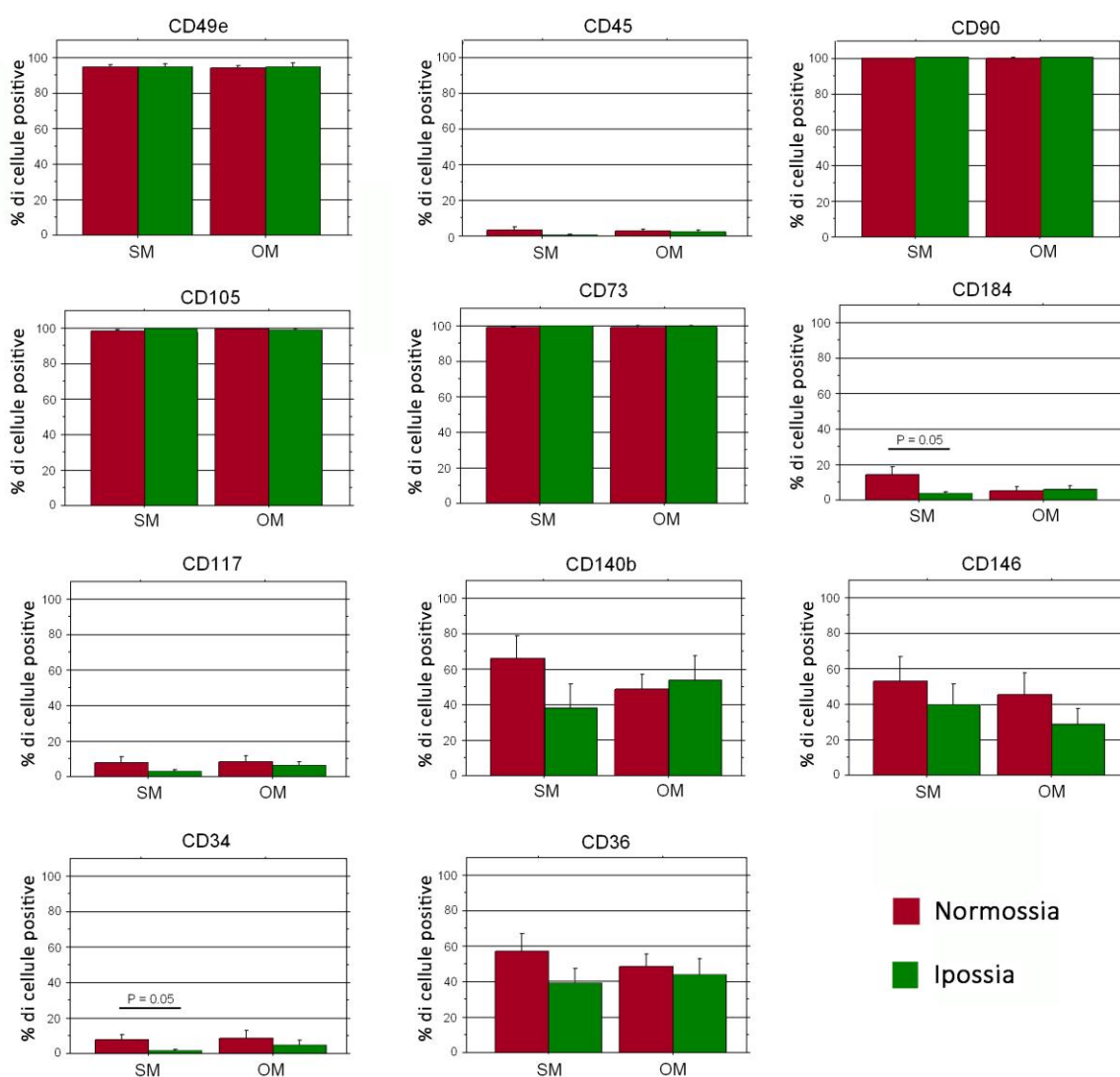
### *Espressione degli antigeni di superficie*

L'immunofenotipo delle cellule isolate è stato caratterizzato a tre tempi. Prima della semina della SVF, al T0, ossia la prima confluenza; al T1, vale a dire dopo 6 giorni di coltura con lo SM o OM in condizioni di ipossia e normossia. La SVF era caratterizzata dalla presenza di una popolazione eterogenea di cellule, dimostrata dalla coesistenza nel pool cellulare degli antigeni ematopoietici e mesenchimali (Tabella 2). Alla prima confluenza, le cellule selezionate per adesione dimostravano un aumento dell'espressione dei marcatori mesenchimali e la perdita di espressione degli antigeni ematopoietici (Tabella 2).

Antigene	Descrizione	SVF	T0
CD49e	$\alpha$ 5 integrin, fibronectin receptor	40% $\pm$ 4	93% $\pm$ 5
CD45	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase C	23% $\pm$ 9	6% $\pm$ 6
CD90	Thymus cell antigen 1 (Thy-1)	63% $\pm$ 12	99% $\pm$ 1
CD105	Endoglin	3% $\pm$ 0	88% $\pm$ 15
CD73	Ecto-5'-nucleotidase	43% $\pm$ 13	97% $\pm$ 1
CD184	CXC chemokine receptor type 4 (CXCR4)	4% $\pm$ 1	5% $\pm$ 1
CD117	Mast/stem cell growth factor receptor kit	3% $\pm$ 3	7% $\pm$ 3
CD140b	Platelet-derived growth factor receptor- $\beta$ (PDGFR $\beta$ )	15% $\pm$ 13	44% $\pm$ 35
CD146	Melanoma cell adhesion molecule (MCAM)	18% $\pm$ 9	43% $\pm$ 11
CD34	Hematopoietic progenitor cell antigen 1 (HPCA 1)	45% $\pm$ 5	47% $\pm$ 11
CD36	Thrombospondin receptor, collagen receptor (type I, IV, V)	23% $\pm$ 10	31% $\pm$ 24

**Tabella 2.** Percentuale di espressione (media  $\pm$  SEM) dei marcatori prima della semina del SVF e dopo la prima confluenza (T0) in condizioni di normossia.

La percentuale delle cellule CD36+, un tipico marcatore delle MSC derivate dal tessuto adiposo, era aumentata negli stadi successivi della coltura (Tabella 2). Quando le cellule erano mantenute alle due tensioni di ossigeno, l'ipossia ha ridotto significativamente il numero di cellule che esprimevano il CD184 ( $p=0,05$ ) e il CD34 rilevabili in presenza dello SM ( $p=0,05$ ) (Figura 11), e l'intensità di espressione del CD105 con l'OM (Tabella 3).



**Figura 111.**Espressione degli antigeni di superficie nelle ASC mantenute in ipossia e normossia ( $n=6$ ). L'espressione dei marcatori di superficie è stata valutata al tempo T1 tramite citometria a flusso. L'analisi ha rilevato che l'ipossia induce una significativa riduzione della percentuale di CD34+ e CD184+ nello SM. Media  $\pm$  SEM.

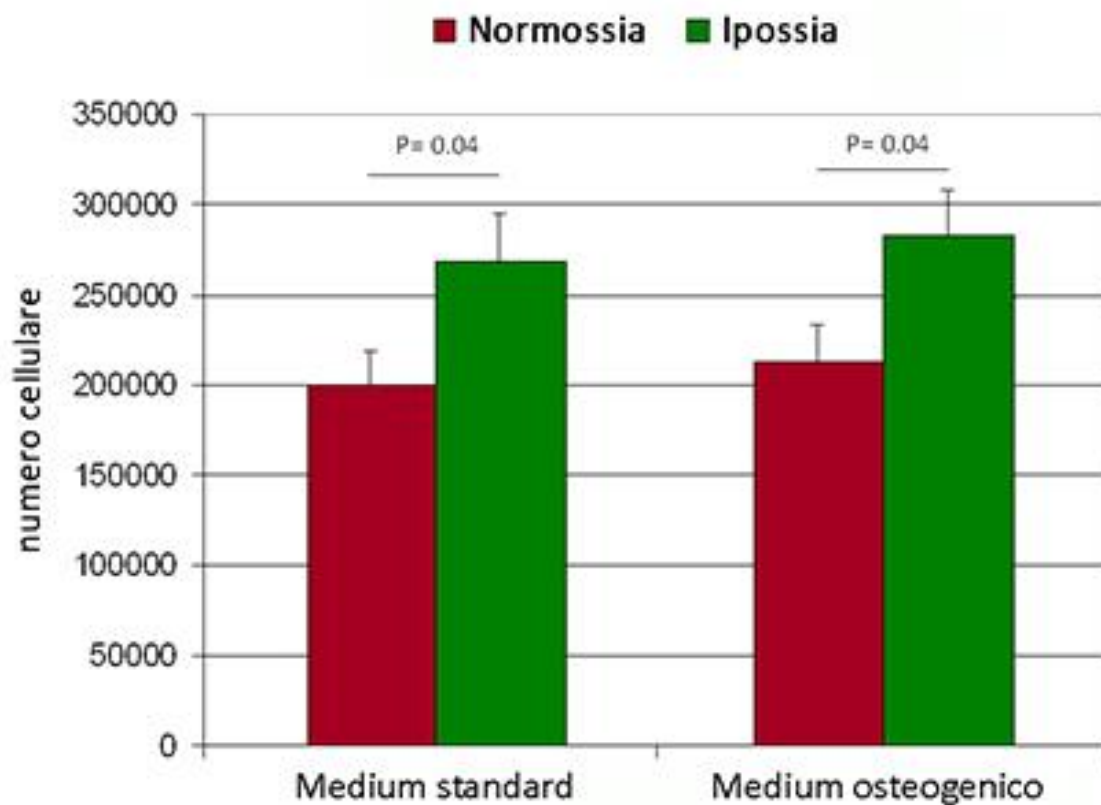
Antigene di superficie	Medium standard			Medium osteogenico		
	Ipossia	Normossia	P	Ipossia	Normossia	P
CD49e	3±0	4±0	0.255	4±0	4±1	0.838
CD105	14±6	26±5	0.417	8±1	17±4	0.05
CD73	14±3	14±2	0.958	12±2	11±1	0.642
CD90	195±27	281±45	0.143	237±45	153±17	0.101

**Tabella 3.** Intensità di fluorescenza media (MFI) (media ± SEM) dei differenti antigeni nelle ASC coltivate con medium standard o osteogenico in condizioni di ipossia o normossia.



### ***Proliferazione cellulare***

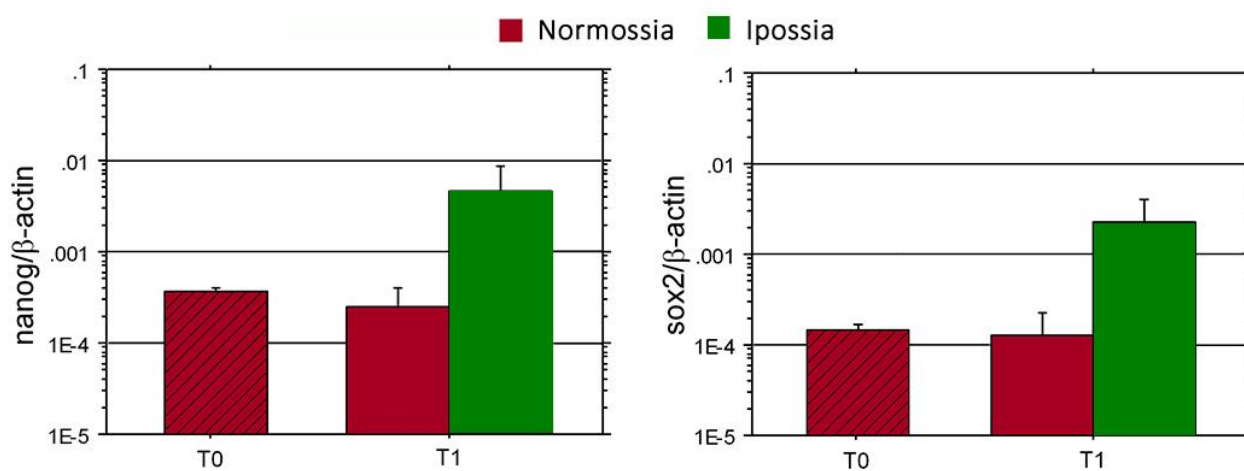
L'effetto dell'ipossia sulla proliferazione cellulare è stato valutato sulle ASC coltivate con lo SM e l'OM per sei giorni. Come riportato nella figura 12, abbiamo osservato che la bassa concentrazione di ossigeno favoriva la proliferazione cellulare nelle condizioni standard e differenzianti ( $p=0,04$  ipossia vs. normossia in entrambe le condizioni di coltura).



**Figura 12.** L'effetto dell'ipossia sulla proliferazione delle ASC ( $n=6$ ). Le cellule sono state mantenute con lo SM o OM, in condizioni ipossiche o normossiche fino al tempo T1. Il numero di cellule vitali è stato contato con il colorante eritrosina B. L'ipossia ha indotto un significativo aumento della proliferazione delle ASC in entrambe le condizioni di coltura. Media $\pm$ SEM.

### Espressione dei geni di staminalità

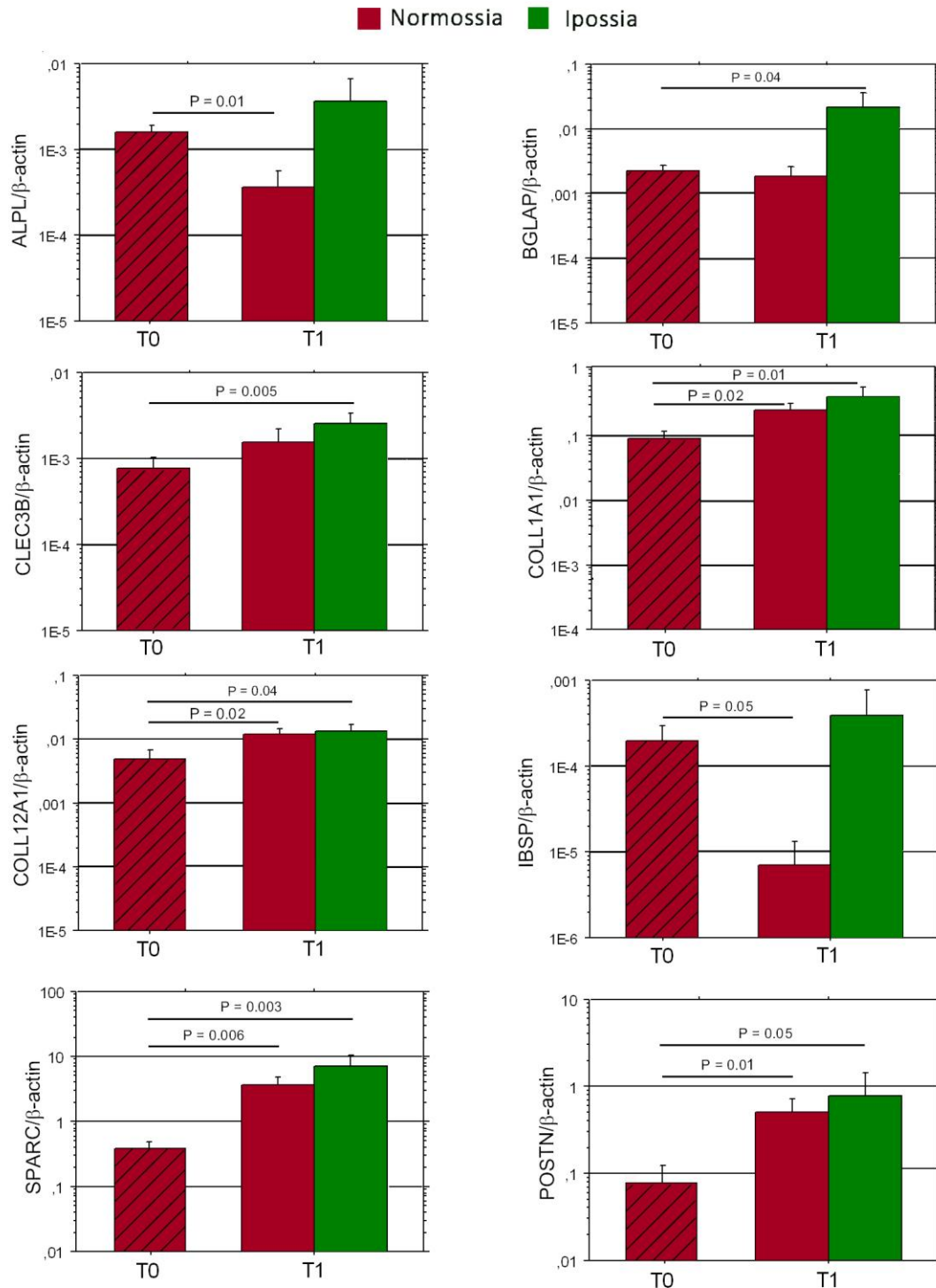
Per saggiare l'effetto dell'ipossia sullo stato di staminalità delle ASC, è stata analizzata l'espressione genica di *OCT4*, *NANOG* e *SOX2* tramite Real Time PCR al T0 e dopo 6 giorni di coltura nello standard medium (T1). Il trascritto di *OCT4* non è stato rilevato in alcuna condizione di coltura delle ASC, tuttavia a basse tensioni di ossigeno i livelli di trascritto di *NANOG* e *SOX2* aumentavano dal T0 al T1 (Figura 13).



**Figura 13.** Effetto dell'ipossia sull'espressione dei geni di staminalità nelle ASC (n=6). I livelli di espressione dell'mRNA di NANOG e SOX-2 sono stati valutati tramite Real-Time PCR sulle cellule coltivate nello SM fino al tempo T1 a comparati con l'espressione basale, il tempo T0. L'ipossia ha favorito l'espressione di entrambi i geni di staminalità. I risultati sono espressi come media  $\pm$  SEM del rapporto tra "il gene di interesse" e la  $\beta$ -actina (scala Log 10).

### ***Espressione dei geni del differenziamento osteogenico***

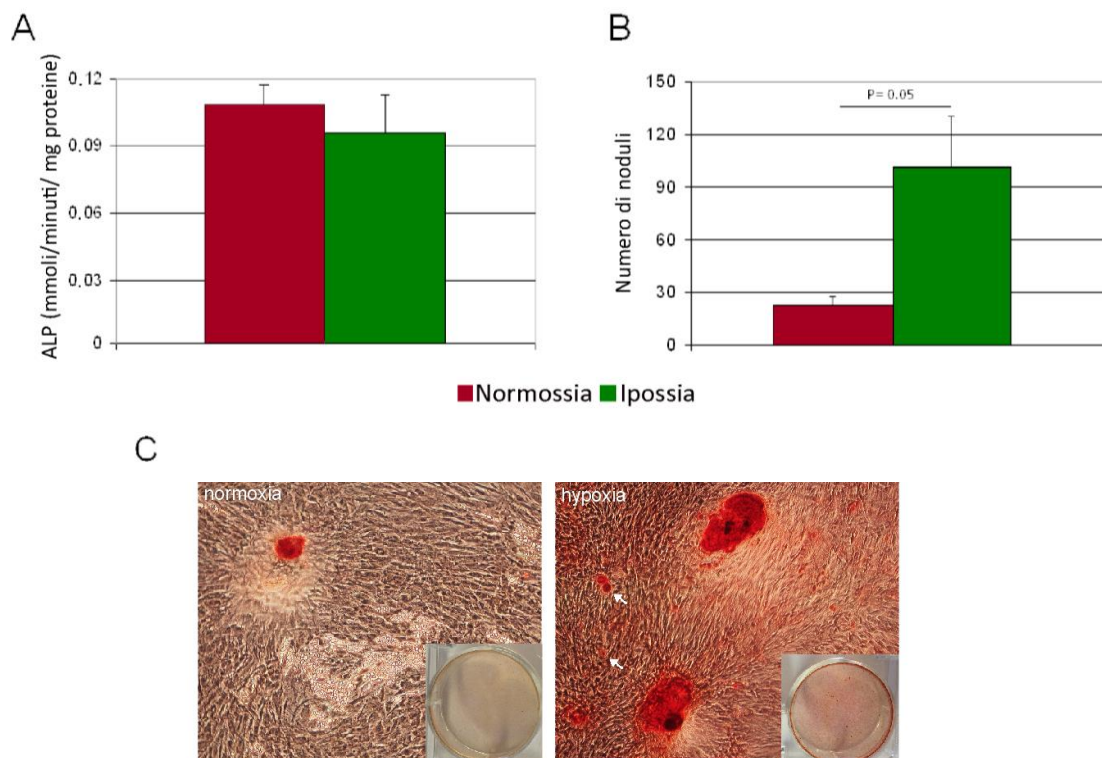
Per determinare l'effetto dell'ipossia sul differenziamento osteogenico delle ASC, abbiamo valutato l'espressione genica delle proteine della matrice extracellulare, sia le proteine collageniche (*COL1A1*, *COL12A1*) che le proteine non collageniche (*CLEC3B*, *ISBP*, *POSTN*, *SPARC*, e *BGLAP*), e l'*ALPL*. Dopo 6 giorni di coltura in terreno differenziante osteogenico (T1), l'ipossia ha promosso l'espressione di gran parte dei geni analizzati, anche se con notevole variabilità ed in misura diversa. In particolare, in normossia l'espressione dell'*ALPL* ( $p=0,01$ ) e *IBSP* ( $p=0,05$ ) era diminuita dal T0 al T1, mentre in condizioni ipossiche l'espressione genica era aumentata. L'aumento dell'espressione di *BGLAP* ( $p=0,.$ ) e *CLEC3B* ( $p=0,005$ ) era statisticamente significativo in condizioni di ipossia, mentre non era significativo in normossia. In fine, la variazione dell'espressione del *COL1A*, *SPARC* e *POSTN* era maggiormente pronunciata nel microambiente ipossico (Figura 14).



**Figura 14.** Effetto dell'ipossia sull'espressione dei geni del differenziamento osteogenico nelle ASC (n=6). L'espressione dei marcatori osteogenici è stata valutata dopo 6 giorni di coltura con OM in ipossia e in normossia (T1) e comparata con l'espressione basale (T0). La coltura in ipossia favorisce il potenziale osteogenico delle ASC rispetto alla coltura in normossia. I risultati sono espressi come media  $\pm$  SEM del rapporto tra il gene di interesse e la  $\beta$ -actina (scala Log 10).

## Mineralizzazione

L'attività biochimica della fosfatasi alcalina è stata valutata nelle ASC coltivate con il terreno differenziante osteogenico fino al raggiungimento della seconda confluenza (T2). La figura 15A mostra che la tensione di ossigeno non influenza l'attività enzimatica dell'ALP. Dopo l'aggiunta di  $\beta$ -glicerofostato, l'agente mineralizzante, abbiamo effettuato l'osservazione giornaliera della coltura cellulare, e dopo 9-12 giorni abbiamo notato che le ASC mantenute in ipossia mostravano un maggior numero di noduli minerali, visibili anche senza colorazione. Poiché le cellule tendevano a staccarsi dal supporto di coltura cellulare, dimostrando segni di sofferenza, il tempo T3 è stato fissato a 9 giorni invece che 21 giorni come richiesto dalle procedure standard per saggiare la mineralizzazione *in vitro* (221). La deposizione dei noduli minerali è fortemente promossa dall'ipossia. Infatti, il numero dei noduli minerali formati in condizioni di ipossia era significativamente maggiore rispetto alla condizione di normossia ( $p=0,05$ ) (Figura 15).



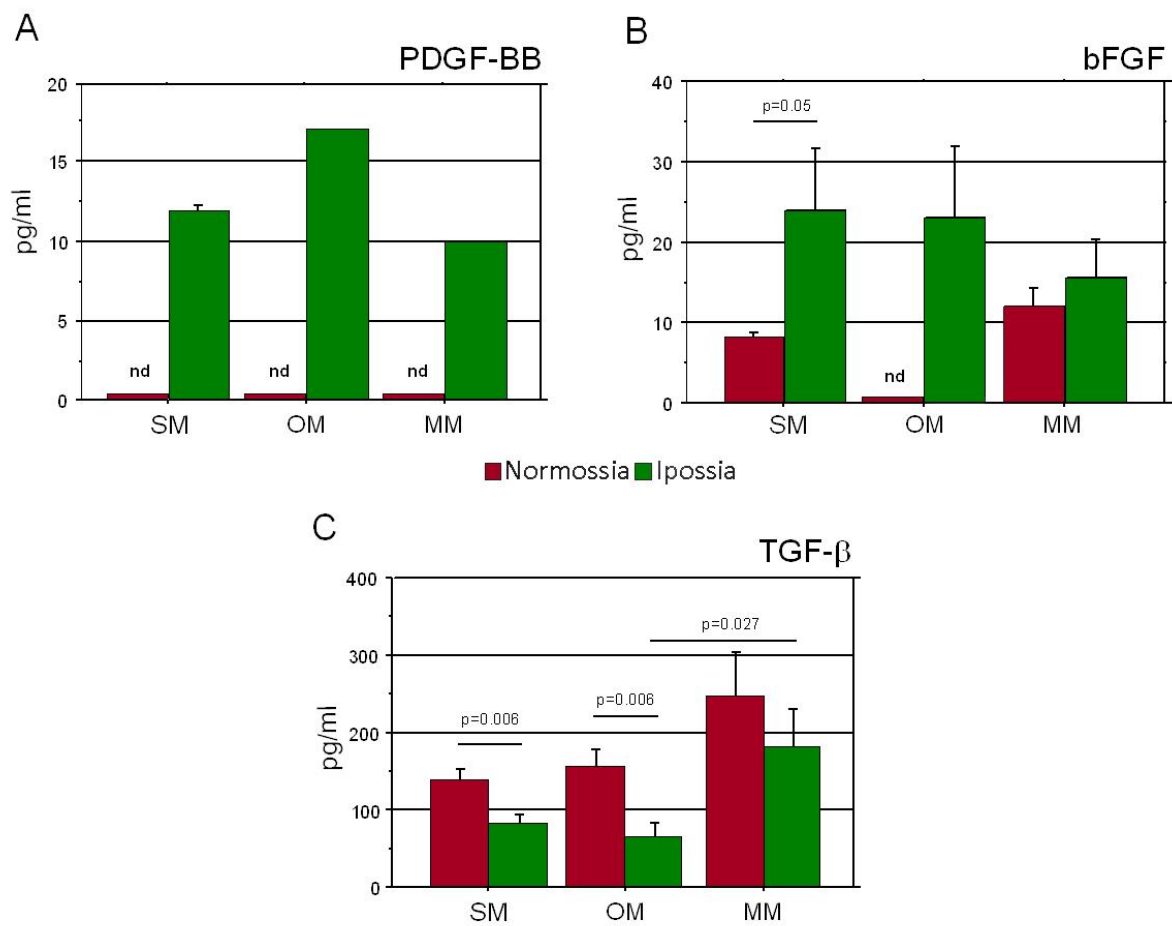
**Figura 15.** Effetto dell'ipossia sull'attività biochimica della ALP e la deposizione dei noduli minerali nelle ASC (n=6). A: Attività biochimica della ALP. B: Numero di noduli di calcio fosfato depositati dalle ASC. C: Immagini rappresentative dei noduli minerali colorati con rosso di alizarina (barra 100  $\mu$ m). A bassa tensione di ossigeno le ASC formano un numero di noduli tre volte maggiore. Inoltre, i noduli depositati in condizioni ipossiche erano di dimensioni differenti (C, frecce). I risultati sono espressi come media  $\pm$  SEM.

### ***Quantificazione dei fattori di crescita rilasciati dalle ASC***

Abbiamo anche valutato se l'ipossia influenzava il rilascio dei fattori di crescita implicati nella proliferazione e nel differenziamento osteogenico. Abbiamo eseguito saggi immunoenzimatici per il PDGF-BB, bFGF e TGF- $\beta$  ai tempi T1, T2 e T3 (Figura 16).

Il PDGF-BB e il bFGF erano quantificabili solo in tre dei sei campioni, e il loro rilascio era aumentato in ipossia, in tutte le condizioni di coltura. In particolare, il rilascio del PDGF-BB era al di sotto del limite di quantificazione quando le cellule erano mantenute in normossia, mentre una discreta quantità del fattore di crescita era quantificabile in condizioni di ipossia (Figura 16 A). Quando le ASC erano coltivate in terreno di coltura standard, il bFGF era rilasciato in entrambe le condizioni di ossigeno, tuttavia la quantità rilasciata era significativamente maggiore in ipossia rispetto alla normossia ( $p=0,05$ ). Nelle ASC mantenute in coltura con terreno differenziante osteogenico, il bFGF era misurabile soltanto in ipossia. La differenza tra ipossia e normossia si annullava in presenza del terreno di coltura mineralizzante (Figura 16 B).

Diversamente, il TGF- $\beta$  era quantificabile in tutte le condizioni, sebbene il suo rilascio fosse significativamente minore in condizioni ipossiche, sia quando le ASC erano mantenute in terreno standard ( $p=0,006$ ) che in terreno osteogenico ( $p=0,006$ ). Al tempo T3, l'ipossia non ha più effetto, poiché il rilascio del TGF- $\beta$  da parte delle ASC coltivate con il terreno mineralizzante era significativamente aumentato rispetto alle ASC in terreno osteogenico ( $p=0,027$ ).



**Figura 16.** Rilascio di bFGF, TGF $\beta$ , e PDGF-BB da parte delle ASC (n=6). Il rilascio dei fattori di crescita è stato valutato su cellule coltivate per 6 giorni nello SM o OM in ipossia e normossia (T1) e dopo l'induzione della mineralizzazione con lo MM (T3). L'ipossia induce il rilascio dei fattori mitogeni e limita la produzione del TGF $\beta$ . Media  $\pm$  SEM.

## DISCUSSIONE

Perdite di sostanza del tessuto osseo possono essere curate con tecniche di medicina rigenerativa. Le ASC rappresentano una ricca fonte di cellule staminali adulte che possono fornire varie possibilità per le applicazioni terapeutiche in campo ortopedico quando le capacità fisiologiche di rigenerazione ossea sono inadeguate o compromesse. Oltre alla quantità sufficiente di cellule staminali, i requisiti essenziali per una terapia cellulare efficace sono la multipotenza, la capacità proliferativa e il differenziamento osteogenico. Un metodo efficace per supportare l'utilizzo delle ASC nel campo clinico è l'applicazione di condizioni di coltura che riproducano le condizioni microambientali dell'osso danneggiato.

Obiettivo dello studio è stato quello di verificare se il microambiente ipossico in cui vengono trapiantate le MSC permette agli osteoprogenitori di svolgere le loro funzioni. A tale scopo è stata valutata l'influenza della bassa tensione di ossigeno sulla crescita cellulare e sul differenziamento osteogenico delle ASC umane.

I risultati hanno dimostrato che l'ipossia ha una duplice azione: promuovere la proliferazione cellulare e mantenere lo stato di staminalità in assenza di stimoli pro-osteogenici, e indurre il differenziamento osteogenico in condizioni simili a quelle proprie del microambiente osseo. Infatti, quando le cellule sono mantenute in un terreno privo di stimoli differenziativi, la proliferazione e l'espressione dei geni di staminalità (222) aumentano, a dimostrazione del fatto che l'ipossia favorisce il mantenimento dello stato indifferenziato delle ASC.

Un tasso proliferativo maggiore si osserva anche in presenza del terreno differenziante osteogenico. Tuttavia, il risultato più sorprendente riguarda l'aumentato potenziale osteogenico indotto dall'ipossia, dal momento che la formazione dei noduli minerali era più rapida e considerevolmente maggiore rispetto alla controparte in normossia. Questo risultato è stato confermato dall'analisi molecolare, poiché la bassa tensione di ossigeno promuove l'espressione genica delle proteine collageniche e non collageniche, correlate con il differenziamento osteogenico e la mineralizzazione delle MSC (223). Inoltre, l'aumentata espressione del trascritto dell'*ALPL* suggerisce che il processo di mineralizzazione è favorito dalle condizioni ipossiche (224).



Inoltre abbiamo rilevato alcune differenze riguardanti l'espressione degli antigeni di membrana espressi dalle ASC (225). L'ipossia, in assenza di stimoli osteogenici, diminuiva l'espressione del CXCR4 (CD184), un alfa-chemochina recettore-specifico dello *stromal derived factor-1* (SDF-1). L'asse SDF-1/CXCR4 è coinvolto nella mobilizzazione e nel reclutamento delle MSC del midollo osseo e supporta il processo di riparazione delle fratture ossee (226). Studi recenti hanno dimostrato che una iporegolazione dell'espressione di CXCR4 si correla con l'inibizione della capacità di homing delle MSC ma non influisce sulla capacità proliferativa delle cellule (227).

Inoltre abbiamo osservato una significativa riduzione del numero delle cellule CD34 positive. Coerentemente con questo risultato, Valorani *et al.* hanno osservato che l'espressione del CD34 era diminuita nelle ASC mantenute in ambiente ipossico (199). Tuttavia il ruolo del CD34 nella biologia delle ASC non è stato del tutto chiarito: alcuni autori suggeriscono che le ASC CD34-negative siano più responsive al differenziamento osteogenico (228). Nel loro insieme, la iporegolazione del CD184 e del CD34 fa ipotizzare che le cellule mantenute in un microambiente simile alla nicchia staminale preservano il loro stato indifferenziato, benché possano avere una maggiore predisposizione a differenziarsi verso la linea osteogenica.

Per valutare l'attività paracrina nelle diverse condizioni di tensione di ossigeno, sono stati analizzati alcuni fattori di crescita rilasciati dalle ASC, ed in particolare bFGF, PDGF-BB e TGF $\beta$ , poiché è noto il loro ruolo nella fisiopatologia ossea (229). Il PDGF-BB e il bFGF erano quantificabili solo in alcuni campioni e il loro rilascio era favorito nella condizione di ipossia. Questo risultato potrebbe spiegare il maggiore tasso proliferativo delle cellule coltivate in ipossia. Infatti, il PDGF-BB e il bFGF sono noti per le loro proprietà mitogene, e la loro inibizione tramite anticorpi neutralizzanti riduce la crescita delle MSC (230). Inoltre, le MSC coltivate con mezzo di coltura addizionato di PDGF-BB e bFGF aumentano l'indice proliferativo e il numero di divisioni cellulari prima di raggiungere la senescenza (231).

L'ipossia ha indotto una significativa riduzione del rilascio del TGF $\beta$ , sia in presenza che in assenza dei fattori differenzianti. Allo stesso tempo, abbiamo osservato anche un significativo decremento del CD105 (endoglin), recettore accessorio del TGF $\beta$  che può essere influenzato dalle condizioni ipossiche (232). Il TGF $\beta$  esibisce effetti bidirezionali sull'attività degli osteoblasti: da un lato, stimola l'espressione delle proteine della

matrice ossea, dall'altro inibisce il differenziamento osteogenico, specialmente durante gli stadi precoci del differenziamento (233). I nostri risultati suggeriscono che l'ipossia orienta gli effetti TGF $\beta$  verso quest'ultima direzione.

La coltura con bassa tensione di ossigeno è considerata un interessante metodo per migliorare l'efficienza delle terapie cellulari (220). È stato ampiamente dimostrato che l'evento chiave nell'adattamento cellulare alle basse tensioni di ossigeno è l'induzione e la stabilizzazione di HIF1. Una tensione di ossigeno >5% induce la degradazione proteosomale della subunità HIF-1 $\alpha$ , mentre in condizioni ipossiche la proteina HIF-1 $\alpha$  si stabilizza, si dimerizza con HIF-1 $\beta$  e trans-attiva geni implicati in diversi processi cellulari (234). Alcuni autori hanno suggerito che l'attivazione della via di HIF-1 $\alpha$  promuove la rigenerazione ossea *in vivo*, ipotizzando che l'ipossia sia un importante cofattore nella guarigione ossea (235), mentre altri autori hanno dimostrato che l'inibizione dell'attività di HIF-1 non ha un impatto significativo sull'espressione dei marcatori osteogenici (236). È stato suggerito che l'attivazione di HIF-1 $\alpha$  correla con una migliore rigenerazione di ampi difetti ossei, sia utilizzando MSC transgeniche per HIF-1 $\alpha$  (237) sia tramite l'induzione farmacologica (238). Inoltre, prima di esporre le MSC all'ischemia grave nel sito della lesione (da 0,4% a 2,3% pO<sub>2</sub>), il precondizionamento delle cellule *ex vivo* ad una tensione di ossigeno del 1-3% potrebbe essere utile a prevenire l'apoptosi delle cellule trapiantate (239). Utilizzando modelli sperimentali *in vivo* o MSC derivate dal midollo osseo, altri autori hanno dimostrato che l'esposizione prolungata a basse concentrazioni d'ossigeno migliora il potenziale osteogenico e angiogenico delle MSC (239-242).

Mentre la maggior parte della letteratura sulle ASC afferma che l'ipossia favorisce l'espansione cellulare e la staminalità, l'effetto sul differenziamento osteogenico è ancora dibattuto (199, 236, 243-246). I risultati contrastanti potrebbero essere dovuti alle differenti condizioni usate per simulare l'ambiente ipossico, per esempio, il tempo di esposizione a basse concentrazioni di ossigeno. Infatti, nella maggior parte degli schemi sperimentali pubblicati le cellule erano espanse in normossia, ed in seguito indotte a differenziarsi in senso osteogenico in condizioni ipossiche per tre settimane. In tutti questi casi, il potenziale osteogenico delle ASC era inibito, mentre il differenziamento adipogenico e condrogenico era aumentato. Al contrario, cellule precondizionate in ipossia ed successivamente trasferite in normossia aumentavano la

loro capacità di differenziare in osteoblasti. Ciò suggerisce che il pre-condizionamento ipossico potrebbe essere un valido strumento per massimizzare le proprietà rigenerative delle ASC (199). Recentemente, Choi e colleghi (245) hanno dimostrato che l'espansione prolungata delle ASC in condizioni di bassa tensione di ossigeno (fino al terzo passaggio) e il successivo differenziamento osteogenico in condizioni ipossiche non favorisce il processo di mineralizzazione.

Nel nostro studio abbiamo indagato l'effetto della continua esposizione a bassa tensione di ossigeno, ma il differenziamento osteogenico è stato effettuato tempestivamente e la mineralizzazione è stata indotta non appena le ASC raggiungevano la prima confluenza. Questo piano sperimentale è simile a ciò che accade *in vivo*. Negli approcci di terapia cellulare finalizzati a riparare difetti ossei estesi si prevede che le MSC popolino il sito della lesione dove fanno fronte a condizioni di grave ipossia (239). Abbiamo simulato *in vitro* un microambiente simile all'osso, usando additivi che favoriscono il differenziamento osteogenico, ossia, desametasone per attivare la via Wnt/beta-catenina, acido ascorbico per modulare l'assemblaggio delle fibrille di collagene di tipo I, e il beta-glicerofosfato come potente fonte di fosfato inorganico per facilitare la mineralizzazione della matrice extracellulare (247).

I nostri risultati suggeriscono che il trapianto delle ASC nel microambiente ipossico, come previsto nelle applicazioni di medicina rigenerativa in campo ortopedico, non compromette ma piuttosto migliora il loro potenziale osteogenico. Abbiamo saggiato *in vitro* che l'esposizione prolungata a basse concentrazioni di ossigeno mostra un duplice beneficio. In prima istanza, l'ipossia promuove la proliferazione cellulare e il mantenimento dello stato di staminalità, pertanto il pool delle cellule capace di differenziare in osteoblasti è arricchito. In seconda istanza, il risultato più rilevante è che se la combinazione dell'ipossia e degli stimoli pro-osteogenici si realizza precocemente, il processo di differenziamento osteogenico e di mineralizzazione è accelerato.

Questo studio fornisce una base biologica per l'utilizzo delle ASC in campo ortopedico, quando le proprietà fisiologiche di rigenerazione ossea non sono sufficienti o la vascolarizzazione è compromessa. La possibilità di modulare lo stato proliferativo e il differenziamento tramite semplici variazioni delle condizioni di coltura delle ASC

potrebbe essere sfruttata anche per l'espansione cellulare *ex vivo* o per la produzione di costrutti di ingegneria tissutale, apportando anche dei vantaggi significativi in termini di tempo, costi e manipolazione cellulare. Sarà interessante approfondire il meccanismo molecolare che sottende l'attivazione di HIF-1 $\alpha$  e la modulazione dei geni implicati nel differenziamento osteogenico.

Infine, sono necessari studi clinici per dimostrare se il nuovo approccio può realmente avere impatto sui risultati delle applicazioni di medicina rigenerativa.

# EFFETTO DELL'ACIDOSI EXTRACELLULARE SULLA STAMINALITÀ E IL DIFFERENZIAMENTO OSTEOGENICO DELLE CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI

## ***Obiettivo***

Il microambiente extracellulare è in grado di modulare il fenotipo staminale. In particolare, studi precedenti hanno ipotizzato che la concentrazione extracellulare di ioni idrogeno nel contesto della riparazione tissutale può attivare fattori di crescita capaci di favorire la proliferazione e il differenziamento delle cellule staminali (214). Tuttavia, gli effetti dell'acidosi extracellulare sulle MSC sono stati poco studiati (248).

Benché sia stato provato che l'acidosi extracellulare promuove il fenotipo staminale delle cellule staminali tumorali (249), non è ancora stato dimostrato il ruolo del microambiente acido sull'induzione della staminalità in condizioni fisiologiche. Nel 2014, Obokata e colleghi sostenevano di aver ottenuto la riprogrammazione di cellule somatiche in assenza di manipolazione genica, tramite l'esposizione delle cellule al pH acido. Tuttavia, a distanza di pochi mesi, questo articolo è stato ritrattato poiché conteneva molteplici errori che inficiavano la credibilità dello studio (250).

Le variazioni del pH del microambiente cellulare influenzano il processo di formazione ossea e mineralizzazione, poiché l'acidosi inibisce la deposizione della matrice minerale da parte degli osteoblasti e favorisce il riassorbimento osseo da parte degli osteoclasti (210). Numerose sono le condizioni patologiche che determinano uno stato di sub-acidosi: l'infiammazione (251), i traumi e le fratture (207), la degenerazione del disco intervertebrale (252), la carie dentaria (253). In alcune di queste, il ruolo delle MSC nel condizionare la guarigione è determinante.

Come si è illustrato nel capitolo precedente, il midollo osseo (BM) è la fonte di MSC più comunemente utilizzata per applicazioni di medicina rigenerativa applicata all'ortopedia. La percentuale di BM-MSC ottenute dal midollo osseo è tuttavia molto bassa, pari a circa lo 0,01-0,001 % delle cellule mononucleate (3). La polpa dentale è ritenuta una fonte alternativa di MSC in odontoiatria e chirurgia maxillo-facciale. Infatti, notevole è l'efficienza di isolamento delle cellule staminali da tale sede, e relativamente semplice la procedura per ottenere tali elementi (88, 106, 110). Il

potenziale osteoblastico delle DPSC è stato ampiamente dimostrato sia *in vitro* che *in vivo* (254).

In questo studio ci si è proposti di verificare se una variazione del pH extracellulare può condizionare il comportamento delle MSC anche in vista del loro impiego in medicina rigenerativa. Si è pertanto valutato l'effetto dell'acidità (pH 6.5, pH 6.8, pH 7.1 e pH 7.4) sulla vitalità, la proliferazione, la staminalità, e il differenziamento osteogenico delle MSC, usando come modelli cellulari sia le BM-MSC che le DPSC.

## MATERIALE E METODO

### *Isolamento e coltura delle MSC*

Le DPSC sono state ottenute dalla polpa dentale di denti sani, estratti in corso di trattamenti ortodontici in pazienti con età fra i 14 e i 16 anni. La procedura è stata approvata dal “Institutional Review Board” del “Centre of Dental Medicine” dell’Università di Zurigo dopo consenso informato sottoscritto dai tutori dei pazienti minorenni. I campioni di DPSC sono stati resi anonimi in modo irrevocabile.

La superficie del dente è stata ripulita e, per isolare il tessuto pulpare, è stata effettuata un'incisione alla giunzione amelo-cementizia tramite fresa dentale sterile. La polpa dentale è stata separata dalla corona e dalla radice, e successivamente digerita con 3 mg/ml di collagenasi di tipo I (Sigma-Aldrich) e 4 mg/ml di dispasi (Sigma-Aldrich) per 1 ora a 37°C. La sospensione di singole cellule è stata ottenuta utilizzando un filtro di 70 µm (BD Falcon, Milano, Italia).

Le BM-MSC sono state acquistate dalla American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA).

Le DPSC e le BM-MSC sono state mantenute in Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium/ Nutrient Mixture F-12 Ham (DMEM/F12) (Sigma-Aldrich), addizionato con il 10% di FBS (Sigma-Aldrich), penicillina 100 U/ml e streptomina 100 mg/ml (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA) a 37 °C e 5% CO<sub>2</sub>. Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti con le DPSC a passaggio 3 o 4.

Per effettuare gli esperimenti, i terreni di coltura ai pH specifici (6.5, 6.8, 7.1 e 7.4) sono stati preparati usando diverse concentrazioni di sodio bicarbonato, secondo l’equazione di Henderson-Hasselbach. Il pH del mezzo di coltura è stato misurato prima di ogni esperimento con un pH-metro digitale (6230N, Jenco, San Diego, CA).

### ***Proliferaazione cellulare***

Le DPSC sono state seminate in piastra da 6 pozzetti (100.000 cellule/pozzetto) in terreno di coltura completo. Dopo 24 ore, il mezzo di coltura è stato sostituito con terreno a diverso pH. La crescita cellulare è stata valutata dopo 7 giorni di coltura tramite conta cellulare diretta con eritrosina B, colorante di esclusione per le cellule non vitali. L'esperimento è stato ripetuto tre volte, con due replicati per ogni condizione.

### ***Saggio di crescita cellulare in condizioni di indipendenza da ancoraggio***

Le DPSC e le BM-MSK sono state seminate in piastra da 48 pozzetti (15.000 cellule/pozzetto) trattate con il PolyHEMA (Sigma), un polimero utilizzato per creare condizioni di non adesione alla plastica. È stato utilizzato il DMEM-F12 a diverso pH, a cui sono stati aggiunti progesterone 20 nM, putrescina 10mg/ml, sodio selenite 30 nM, apo-transferrina 100 mg/ml e insulina 25 mg/ml (Sigma). Due volte alla settimana sono stati aggiunti "Epidermal Growth Factor" (EGF) 20 ng/ml e il bFGF 10 ng/ml (PeproTech, London, UK). Dopo 10 giorni sono state acquisite immagini in campo chiaro degli sferoidi con il microscopio NIKON ECLIPSE TE 2000-S. L'analisi del diametro delle sfere è stata effettuata col software NIS Element Image Software BR 4.00.00 (Nikon Instruments, Firenze, IT). L'esperimento è stato ripetuto tre volte, con tre replicati per ogni condizione di pH.



## ***Analisi dell'espressione genica***

L'espressione genica è stata analizzata su DPSC e BM-MSC mantenute in terreno standard ai diversi pH dopo 7 giorni; nelle DPSC coltivate con il terreno osteogenico (terreno standard addizionato con acido L-ascorbico 2-fosfato 50 mg/ml e desametasone  $10^{-8}$  M) ai diversi pH dopo 7 giorni (T1) e dopo 14 giorni (T2). È stato quantificato il trascritto dei geni correlati alla staminalità (222) e al potenziale osteogenico (218) delle MSC (tabella 4). L'RNA è stato estratto con il kit NucleoSpin RNAII (Macherey-Nagel, Düren, Germania), seguendo il protocollo di estrazione specifico per le cellule animali. L'eluizione finale è stata effettuata utilizzando 30  $\mu$ l di H<sub>2</sub>O DEPC (dietilpolicarbonato). La concentrazione di RNA è stata determinata mediante la lettura allo spettrofotometro a 260 nm e 280 nm. Un rapporto A<sub>260</sub>/280 fra 1.7 e 2.0 depone per un RNA sufficientemente puro.

La trascrizione inversa di RNA totale è stata eseguita utilizzando il Gene Amp RNA PCR Core Kit (Applied biosystems, Foster City, CA). A una quantità di RNA totale pari ad 1  $\mu$ g sono stati aggiunti MgCl<sub>2</sub> 5mM, PCR Buffer 1x, dGTP, dATP, dTTP e dCTP 1mM, Oligo dT 2.5  $\mu$ M, Rnase Inhibitor 1U/ $\mu$ l e MuLV Reverse Transcriptase 2.5 U/ $\mu$ l, per un volume finale di 20  $\mu$ l. Il campione è stato sottoposto a fasi successive di incubazione: a temperatura ambiente per 10', a 42°C per 15', a 99°C per 5' ed a 4°C per 5' con termociclatore (I Cycler, Biorad, Milano, Italia). Ogni cDNA ottenuto è stato analizzato mediante lettura spettrofotometrica alle lunghezze d'onda di 260 e 280 nm, al fine di determinarne sia la concentrazione che la qualità. Il valore indicativo di una buona qualità del cDNA è un rapporto A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> pari a 1.8. I campioni sono stati conservati a -20°C fino al momento dell'utilizzo.

La Real time PCR è stata eseguita con lo strumento Light Cycler e il sistema Universal Probe Library (Roche Applied Science, Monza, Italia). I primers e le sonde per ogni saggio sono state selezionate utilizzando un software reperibile in rete chiamato Probe Finder (<https://www.roche-appliedscience.com/sis/rtpcr/upl/index.jsp?id=UP020301>), mentre il saggio migliore per ciascun gene è stato confermato utilizzando Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Tabella 4). Ciascun cDNA (1  $\mu$ g) è stato amplificato e il corrispondente ciclo soglia è stato

riferito ad una curva standard. Il gene housekeeping, rRNA 18s è stato usato come riferimento per normalizzare i dati della Real time PCR, i quali sono espressi come rapporto di cDNA analizzato e cDNA di riferimento. L'esperimento è stato ripetuto tre volte, con due replicati per ogni condizione.

<b>GENE</b>	<b>NUMERO ID</b>	<b>PRIMER (5'-3')</b>	<b>SONDA<sup>a</sup></b>
<b><i>ALPL: fosfatasi alcalina, fegato/osso/rene</i></b>	NM_000478.3	gggtcagctccaccacaa gcattggtgtgtacgtcttg	#52
<b><i>c-MYC: v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog</i></b>	NM_002467.4	gctgcttagacgctggattt taacgttgaggggcatcg	#66
<b><i>COL1A1: collagene, tipo I, alpha I</i></b>	NM_000088.3	cccctggaaagaatggagat aatcctcgagcaccctga	#60
<b><i>KFL4: Kruppel-like factor 4</i></b>	NM_004235.4	ccatctttctccacgttcg agtcgcttcatgtgggagag	#7
<b><i>NESTIN: nestina</i></b>	NM_006617	tgcgggctactgaaaagttc tgtaggcctgtttctcctg	#81
<b><i>NGFR/p75: nerve growth factor receptor</i></b>	NM_002507	cagagcctgcatgaccag gcagagccgttgagaagc	#52
<b><i>OCT-4: POU homeobox 1 classe 5, trascritto variante 1</i></b>	NM_002701.4	cttcgcaagccctcatttc gagaagggaatccgaag	#60
<b><i>rRNA18s: gene housekeeping</i></b>	X03205.1	gcaattattcccatgaacg gggacttaatcaacgaagc	#48
<b><i>SOX-2: SRY (sex determining region Y)-box 2</i></b>	NM_003106.3	gggaatggaccttgatag gcaaagctcctaccgtacca	#65

**Tabella 4.** Espressione genica nelle DPSC. Lista dei primers e delle sonde per analizzare i geni di staminalità e del fenotipo osteogenico. a Numero della sonda per ogni analisi di espressione genica (ProbeFinder: <http://www.roche-applied-science.com>).

### ***Analisi del ciclo cellulare***

Le DPSC sono state sincronizzate nella fase G0 del ciclo cellulare tramite “starvation”. Per ottenere la sincronizzazione, le cellule sono state mantenute per 48 ore nel terreno standard, poi per 48 ore in terreno standard in terreno con lo 0,2 % di FBS per bloccare il ciclo cellulare ed infine per 36 ore in terreno completo con 10% FBS ai diversi pH per far riattivare il ciclo cellulare. Le cellule sono state incubate con 5-bromodesossipuridina (5-BrDU) 77 mM (Sigma-Aldrich) per 20 ore a 37°C, lavate e fissate con etanolo al 75% per 20 minuti in ghiaccio. La denaturazione parziale del DNA è stata effettuata incubando le cellule con HCl, seguito da neutralizzazione con sodio tetraborato. In seguito i campioni sono stati incubati con l’anticorpo monoclonale murino anti-BrDU FITC (BD Bioscience, San Jose, CA), lavati e marcati con il propidio ioduro (PI) 2.5 mg/ml (Sigma-Aldrich). Le analisi monoparametriche e biparametriche sono state effettuate col software WinMDI 2.7 del citometro a flusso EPICS XL-MCL (Beckman Coulter, Fullerton, CA). Il contenuto di DNA e l’incorporazione della 5-BrDU durante la fase S del ciclo cellulare è stata determinata dalla simultanea analisi del PI per il contenuto totale di DNA e dalla FITC coniugata all’anticorpo anti-BrDU. L’esperimento è stato ripetuto tre volte.

### ***Diametro cellulare***

Dopo la sincronizzazione, sono stati allestiti citocentrifugati delle DPSC (10.000 cellule). Successivamente sono state acquisite immagini a campo chiaro col microscopio NIKON ECLIPSE TE 2000-S. L’analisi del diametro cellulare è stata effettuata col software NIS Element Image Software BR 4.00.00. L’esperimento è stato ripetuto tre volte, con tre replicati per ogni condizione.

### ***Immunofluorescenza di Ki67***

Le DPSC sono state coltivate nelle chamber slide di vetro (8.000 cellule/well) nel terreno standard ai diversi pH per 48 ore. In seguito le cellule sono state fissate con paraformaldeide al 3.7% (Sigma-Aldrich) per 20 minuti a temperatura ambiente, e permeabilizzate con Hapes-Triton per 5 minuti. La marcatura con Ki67 è stata analizzata con l'anticorpo monoclonale anti-Ki67 (diluizione 1:75) (DAKO, Milano, IT). Dopo i lavaggi le cellule sono state incubate con l'anticorpo secondario Alexa Fluor 488 nm (diluizione 1:1000) (Life Technologies, Monza, IT) addizionato con blu di Evans (colorante del citoscheletro) allo 0,02% per 1 ora a temperatura ambiente. Infine, i vetrini sono stati lavati e montati. Le cellule sono state osservate al microscopio a fluorescenza NIKON ECLIPSE E8000. Il KI67 index è stato determinato contando i nuclei positivi alla colorazione su un totale di 5 quadranti/vetrino. L'esperimento è stato ripetuto tre volte, con due replicati per ogni condizione.

### ***Saggio di deposizione della matrice minerale***

La deposizione della matrice minerale è stata valutata sulle DPSC sincronizzate nella fase G0 del ciclo cellulare come precedentemente descritto e coltivate con terreno mineralizzante ai diversi pH. Tale terreno consiste in alpha-MEM, 10% FBS supplementato di acido L-ascorbico 2-fosfato 50 mg/ml, desametasone  $10^{-8}$  M e  $\beta$ -glicerofosfato 10mM (Sigma-Adrich). Dopo 21 giorni è stata effettuata la colorazione con rosso di alizarina: le cellule sono state fissate con paraformaldeide al 3.7% in PBS per 20 minuti, incubate con rosso di alizarina 40 mM a pH 4.2 per 1 ora a temperatura ambiente e successivamente lavate con H<sub>2</sub>O ed osservate al microscopio ottico. La colorazione evidenzia in rosso i noduli minerali, in quanto il colorante si lega ai precipitati di calcio. L'esperimento è stato ripetuto tre volte, con due replicati per ogni condizione.

### ***Analisi statistica***

L'analisi statistica è stata eseguita col software StatView 5.01 (SAS Institute, Inc., Cary, NC). I risultati quantitativi sono stati espressi come media aritmetica più o meno l'errore standard della media (SEM). Per valutare l'espressione genica e il diametro cellulare è stato utilizzato il test statistico non parametrico Mann-Whitney, che permette di analizzare le differenze tra valori non appaiati. Per saggiare il numero e il volume delle sfere, la proliferazione e il Ki67 index è stato utilizzato il test statistico Wilcoxon Rank per le differenze tra valori appaiati. Solo i valori di  $p$  inferiori a 0,05 sono stati considerati statisticamente significativi.

## RISULTATI

### ***Formazione di sferoidi cellulari in condizioni di indipendenza di ancoraggio***

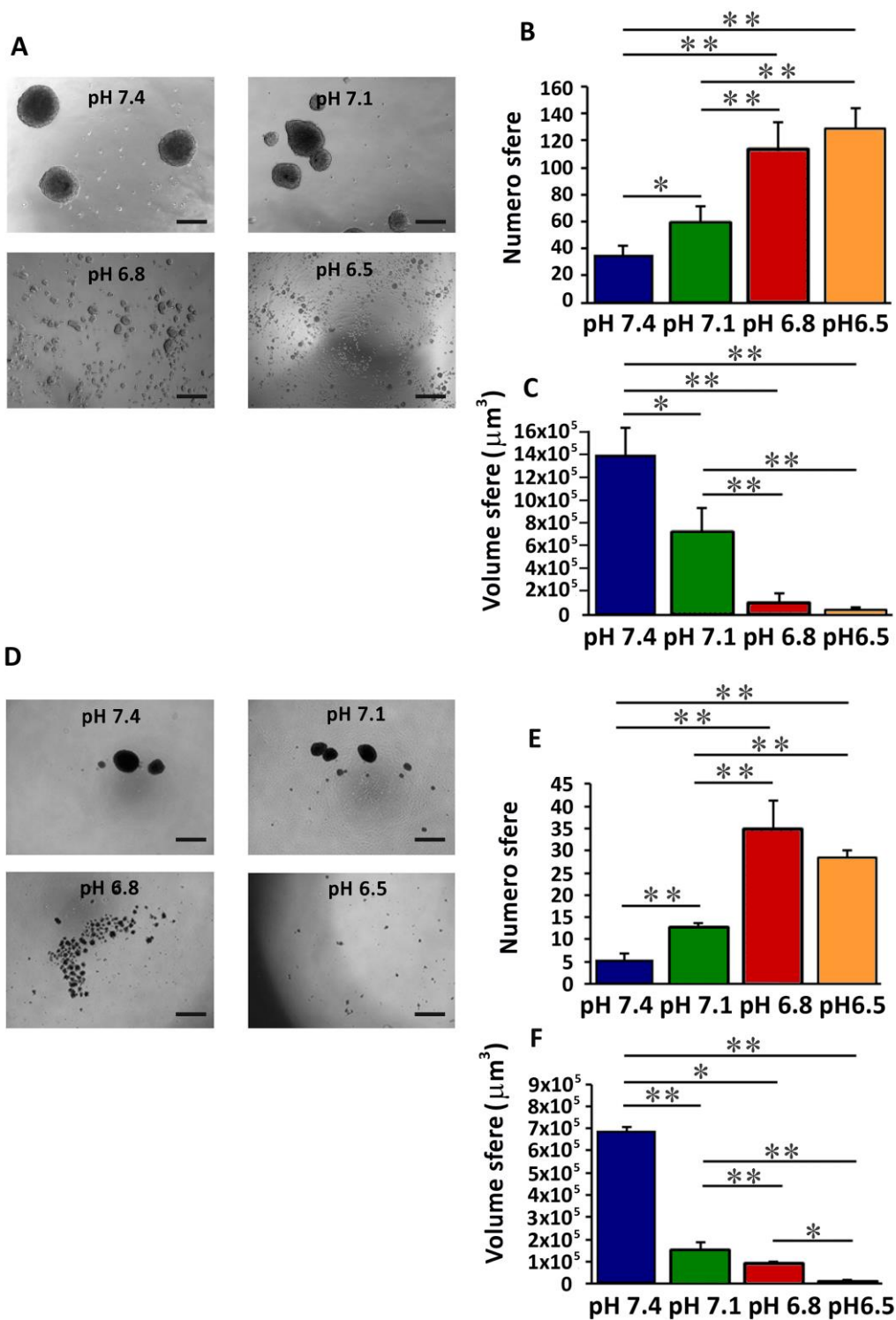
Per saggiare se il pH extracellulare acido condiziona la capacità delle DPSC e delle BM- MSC di formare sferoidi *in vitro*. La capacità delle MSC di formare sferoidi cellulari *in vitro* è associata a un fenotipo più staminale e a una ritardata senescenza replicativa.

Le cellule sono state mantenute in condizione di indipendenza di ancoraggio per 10 giorni con il terreno di coltura ai differenti livelli di pH. Dopo 10 giorni sono state acquisite immagini a campo chiaro delle sfere formate dalle DPSC e dalle BM-MSC (Figura 17 A, D). Le sfere sono state contate ed è stato valutato il loro volume. È stato osservato un significativo aumento del numero delle sfere nelle DPSC mantenute a pH acido. In particolare, un aumento significativo del numero delle sfere si è ottenuto quando le DPSC erano state mantenute a pH 6.5 rispetto a pH 7.1 e a pH 7.4 ( $p=0,0077$ ). Un numero significativamente superiore di sfere è stato osservato anche nelle DPSC coltivate a pH 6.8 rispetto alle cellule mantenute a pH 7.1 e pH 7.4 ( $p=0,0077$ ). Inoltre la formazione degli sferoidi nelle DPSC mantenute a pH 7.1 era significativamente maggiore rispetto alle cellule mantenute a pH fisiologico ( $p=0,0209$ ) (Figura 17 B).

Il numero degli sferoidi e il loro volume hanno mostrato un andamento opposto. Infatti, il volume delle sfere delle DPSC è diminuito significativamente nelle DPSC coltivate a pH 6.5 ( $p=0,0077$ ) rispetto a pH 7.1 e pH 7.4;  $p=0,0077$  per pH 6.8 vs pH 7.1 e pH 7.4;  $p=0,0209$  per pH 7.1 vs pH 7.4) (Figura 17 C).

La capacità dell'acidosi locale di promuovere la formazione delle sfere è stata confermata in un diverso modello di cellule staminali mesenchimali, le BM-MSC (Figura 17 D). A parità di condizioni di coltura il numero di sferoidi formati dalle DPSC è risultato maggiore di quello osservato nelle colture di BM-MSC. Il numero degli sferoidi aumentava significativamente quando le BM-MSC erano coltivate nel terreno di coltura a basso pH ( $p=0,0022$  per pH 6.5 vs pH 7.1 e pH 7.4;  $p=0,0051$  per pH 6.8 vs pH 7.1 e pH 7.4;  $p=0,0022$  per pH 7.1 vs pH 7.4) (Figura 17 E). Così come per le DPSC, il volume delle sfere delle BM-MS è diminuito significativamente a valori di pH extracellulare acido ( $p=0,0262$  per pH 6.5 vs pH 6,8;  $p=0,022$  per pH 6.5 vs pH 7.1 e pH

7.4;  $p=0,0033$  per pH 6.8 vs pH 7.1,  $p=0,0262$  per pH 6.8 vs pH 7.4;  $p=0,0022$  per pH 7.1 vs pH 7.4) (Figura 17 F).



**Figura 17.** L'acidosi extracellulare promuove la capacità delle MSC di formare sferoidi. (A), (D): saggio di formazione delle sfere, immagini rappresentative delle sfere dopo 10 giorni a diversi pH, barra= 500  $\mu\text{m}$ , ingrandimento 4X. (B), (E): grafici del numero di sfere formate ai diversi pH e del volume ( $\mu\text{m}^3$ ) (C),(F). Media di tre esperimenti seminati in triplicato, \*\*  $p<0.01$ , \* $p<0.05$ .

### ***Espressione dei geni di staminalità***

In seguito alla coltura delle DPSC e delle BM-MSC nel mezzo di coltura standard ai diversi valori di pH per 7 giorni, abbiamo analizzato l'espressione dei geni di staminalità.

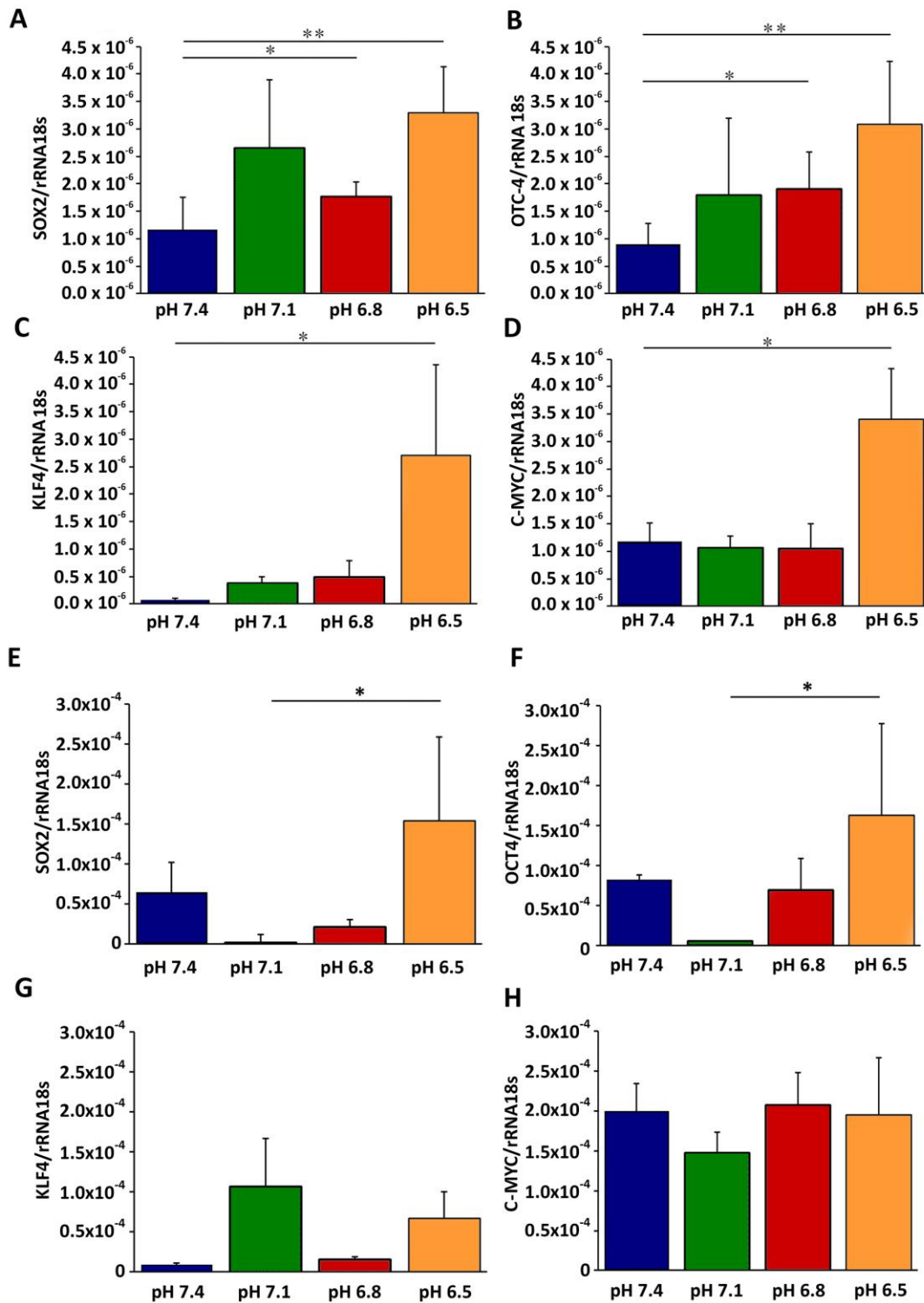
Un aumento significativo dell'espressione di SOX2 è stato osservato nelle DPSC mantenute a pH acido ( $p=0,0062$  per pH 6.5 vs pH 7.4;  $p=0,0176$  per pH 6.8 vs pH 7.4) (Figura 18 A). La stessa tendenza significativa è stata osservata per l'espressione di OCT4 ( $p=0,0022$  per pH 6.5 vs pH 7.4;  $p=0,0229$  per pH 6.8 vs pH 7.4) (Figura 18 B).

Inoltre abbiamo analizzato l'espressione di c-MYC e KLF4. Anche per tali geni è stato trovato lo stesso andamento di espressione; i livelli di trascritto di c-MYC e KLF4 erano infatti significativamente maggiori nelle DPSC coltivate a pH 6.5 rispetto al pH 7.4 ( $p=0,0106$ ) (Figura 18 C-D).

Questi risultati suggeriscono che l'acidosi extracellulare aumenta lo stato di staminalità delle DPSC.

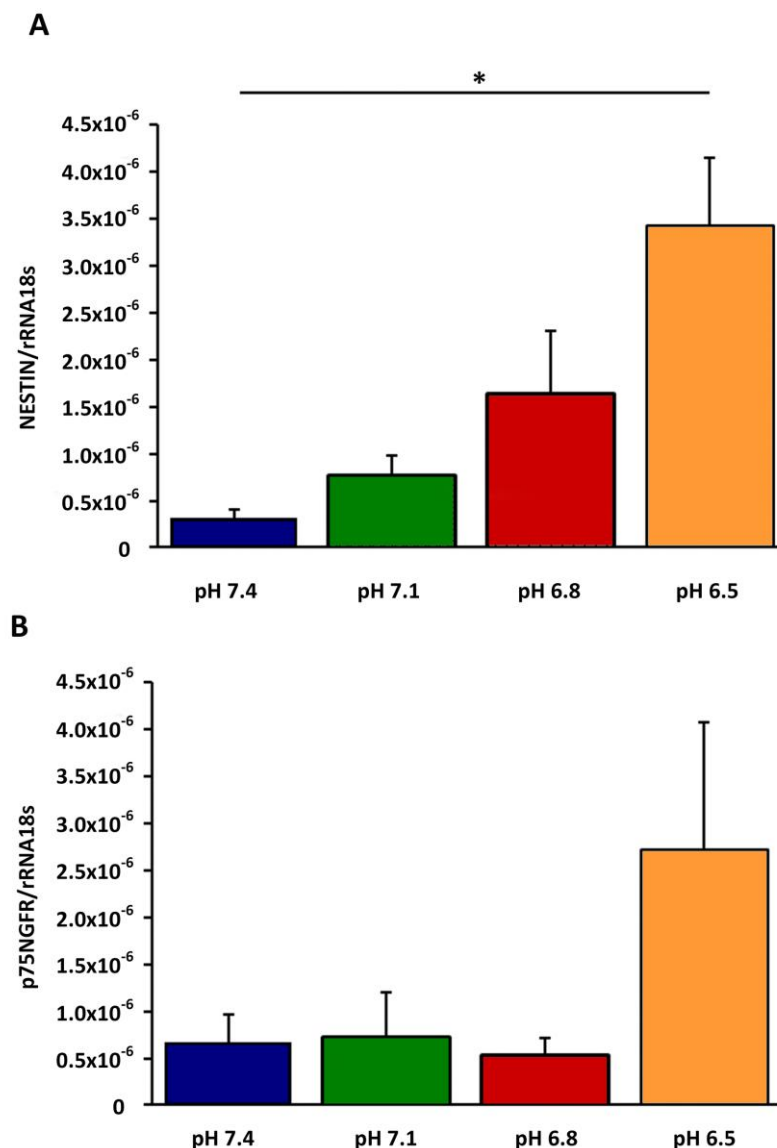
Un effetto simile dell'acidosi locale sull'espressione dei geni di staminalità è stato verificato nelle BM-MSC. Un aumento significativo dell'espressione di OCT4 e SOX2 è stata osservata nelle BM-MSC coltivate a pH 6.5 a confronto con le BM-MSC coltivate a pH 7.1 ( $p=0,0104$ ) (Figura 18 E-F). Nonostante il trend di aumentata espressione di KLF4 nelle BM-MSC mantenute a pH 6.5 e pH 7.1 (Figura 18 G), le differenze non sono risultate statisticamente significative. Diversamente dalle DPSC, l'espressione di c-MYC non era modulata dai livelli di pH del mezzo di coltura (Figura 18 F).





**Figura 18.** Effetto dell'acidosi locale sui geni di staminalità delle MSC. (A), (B), (C), (D), (E), (F), (G), (H): Real Time PCR per SOX2, OCT4, KLF4 e c-MYC nelle DPSC coltivate ai diversi pH per 7 giorni. I risultati sono espressi come media  $\pm$  SEM del rapporto tra il "gene di interesse" e "rRNA 18S". Media di tre esperimenti individuali seminati in duplicato, \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ .

Inoltre, poiché le DPSC derivano dall'ectomesenchima della cresta neurale, abbiamo valutato l'effetto del pH acido sull'espressione di nestina e di NGFR/p75, due marcatori neuronali. Abbiamo osservato che i livelli di trascritto di nestina sono risultati significativamente maggiori nelle cellule mantenute a pH 6.5 rispetto al pH 7.4 ( $p=0,0285$ ) (Figura 19 A). Una maggiore, ma non significativa espressione di NGFR/p75 è stata rilevata nelle DPSC a pH 6.5 in confronto con le altre condizioni di pH (Figura 19 B).

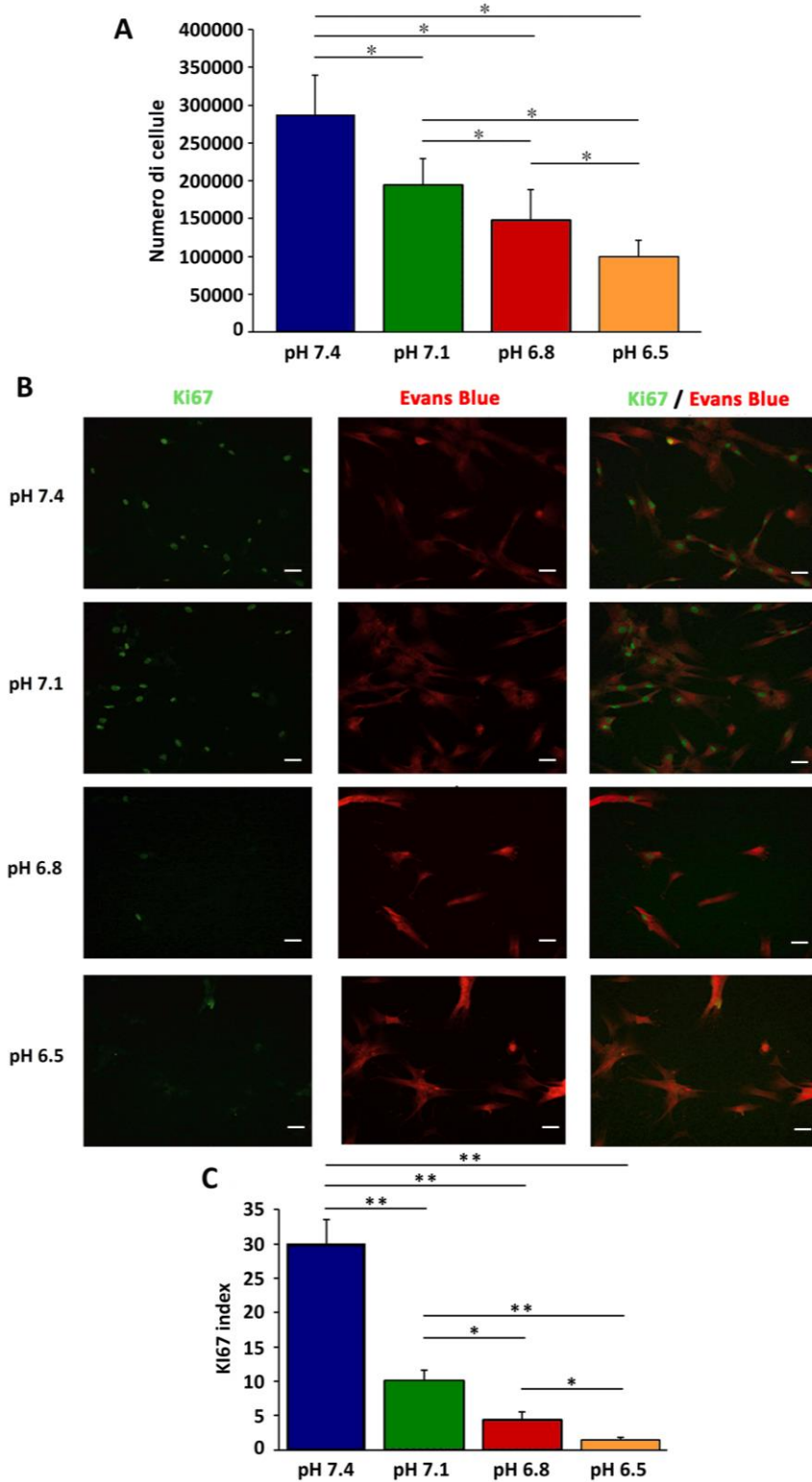


**Figura 19.** Effetto dell'acidosi extracellulare sui geni neuronali delle DPSC. (A), (B): Real time PCR per nestina e p75/NGFR nelle DPSC mantenute ai diversi pH dopo 7 giorni. I risultati sono espressi come la media  $\pm$  SEM del rapporto tra il "gene di interesse" e "rRNA 18s". Media di tre esperimenti individuali seminati in duplicato, \* $p<0.05$ .

### ***Proliferaazione cellulare***

L'effetto dell'acidosi sulla proliferazione delle DPSC è stato determinato coltivando le cellule con il terreno di coltura standard ai diversi valori di pH (7.4, 7.1, 6.8 e 6.5). Dopo 7 giorni le DPSC sono state contate usando una colorazione vitale con eritrosina B . E' stata osservata una significativa diminuzione del numero delle cellule vitali in relazione all'acidità del pH del mezzo di coltura (Figura 20 A). Nello specifico, la proliferazione cellulare a pH acido era significativamente diminuita ( $p=0,0277$  per pH 6.5 vs pH 6.8, 7.1 e 7.4;  $p=0,0277$  per pH 6.8 vs pH 7.1 e pH 7.4;  $p=0,0277$  per pH 7.1 vs pH 7.4).

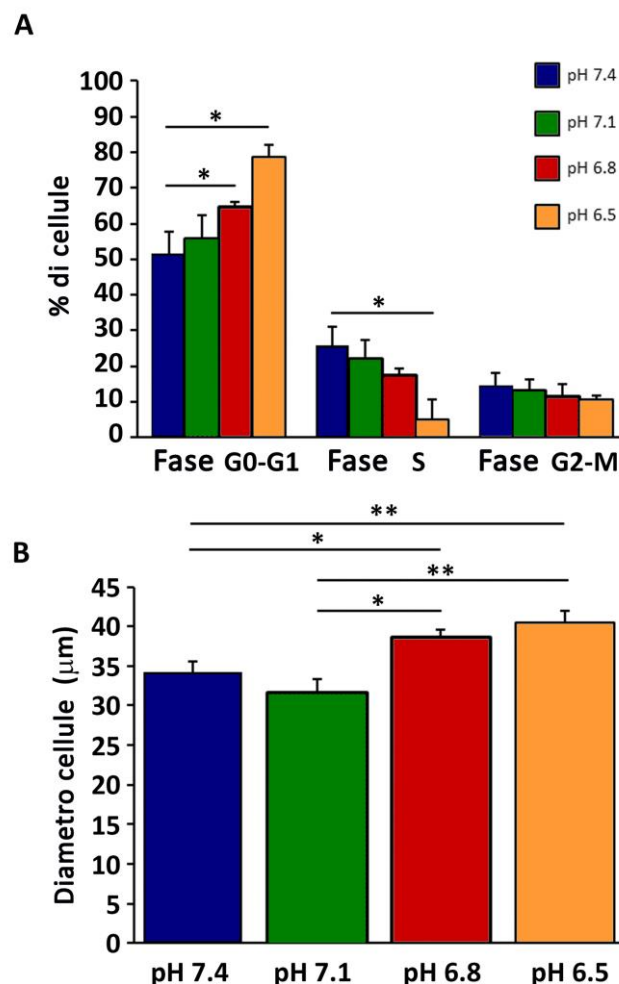
In seconda istanza, per confermare l'effetto dell'acidosi extracellulare sulla proliferazione cellulare, le DPSC sono state sincronizzate nella fase G0 del ciclo cellulare e marcate con un anticorpo per la proteina nucleare Ki67. Come mostrato nella figura 20 B, il pH extracellulare acido diminuisce fortemente l'espressione del Ki67. Abbiamo determinato il Ki67 index come percentuale di cellule positive alla colorazione immunofluorescente del Ki67 nucleare. Ai bassi valori di pH del mezzo di coltura, il Ki67 index diminuiva significativamente ( $p=0,0117$  per pH 6.5 vs pH 6.8;  $p=0,0051$  per pH 6.5 vs pH 7.1 e pH 7.4;  $p=0,00277$  per pH 6.8 vs pH 7.1;  $p=0,0051$  per pH 6.8 vs 7.4;  $p= 0,0051$  per pH 7.1 vs pH 7.4) (Figura 20 C).



**Figura 20.** L'acidosi extracellulare inibisce la proliferazione cellulare. (A): proliferazione delle DPSC dopo 7 giorni di coltura ai diversi livelli di pH. Media di tre esperimenti seminati in duplicato, \* $p < 0.05$ . (B): colorazione immunofluorescente per Ki67 delle DPSC sincronizzate in fase G0 del ciclo cellulare ai diversi valori di pH, rosso (Evans Blu) è il citoscheletro, verde è la proteina nucleare Ki67, barra= 500  $\mu\text{m}$ , ingrandimento 20X. (D): Ki67 index della colorazione immunofluorescente. Media di tre chamber slide, 10.000 cellule per vetrino, contanti 5 campi per vetrino, \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ .

## Analisi del ciclo cellulare

Dopo la sincronizzazione, le DPSC sono state indotte a rientrare nel ciclo cellulare tramite mezzo di coltura supplementato di FBS ai diversi valori di pH (6.6, 6.8, 7.1 e 7.4). La condizione di acidosi extracellulare (pH 6.5 -6.8), ha indotto significativamente la percentuale delle cellule nella fase G0-G1 del ciclo cellulare rispetto al mezzo di coltura con pH 7.4 (79,03%  $\pm$  5,30 vs 51,03%  $\pm$  6,11 della popolazione cellulare,  $p=0,0495$ ; 65,53  $\pm$  1,06 vs 51,03  $\pm$  6,11 della popolazione cellulare,  $p=0,0495$ ). Lo stato quiescente delle DPSC favorito dal pH 6.5 è stato confermato dalla contestuale significativa riduzione delle cellule nella fase S del ciclo cellulare ( $p=0,0495$  per pH 6.5 vs pH 7.4) (Figura 21 A).



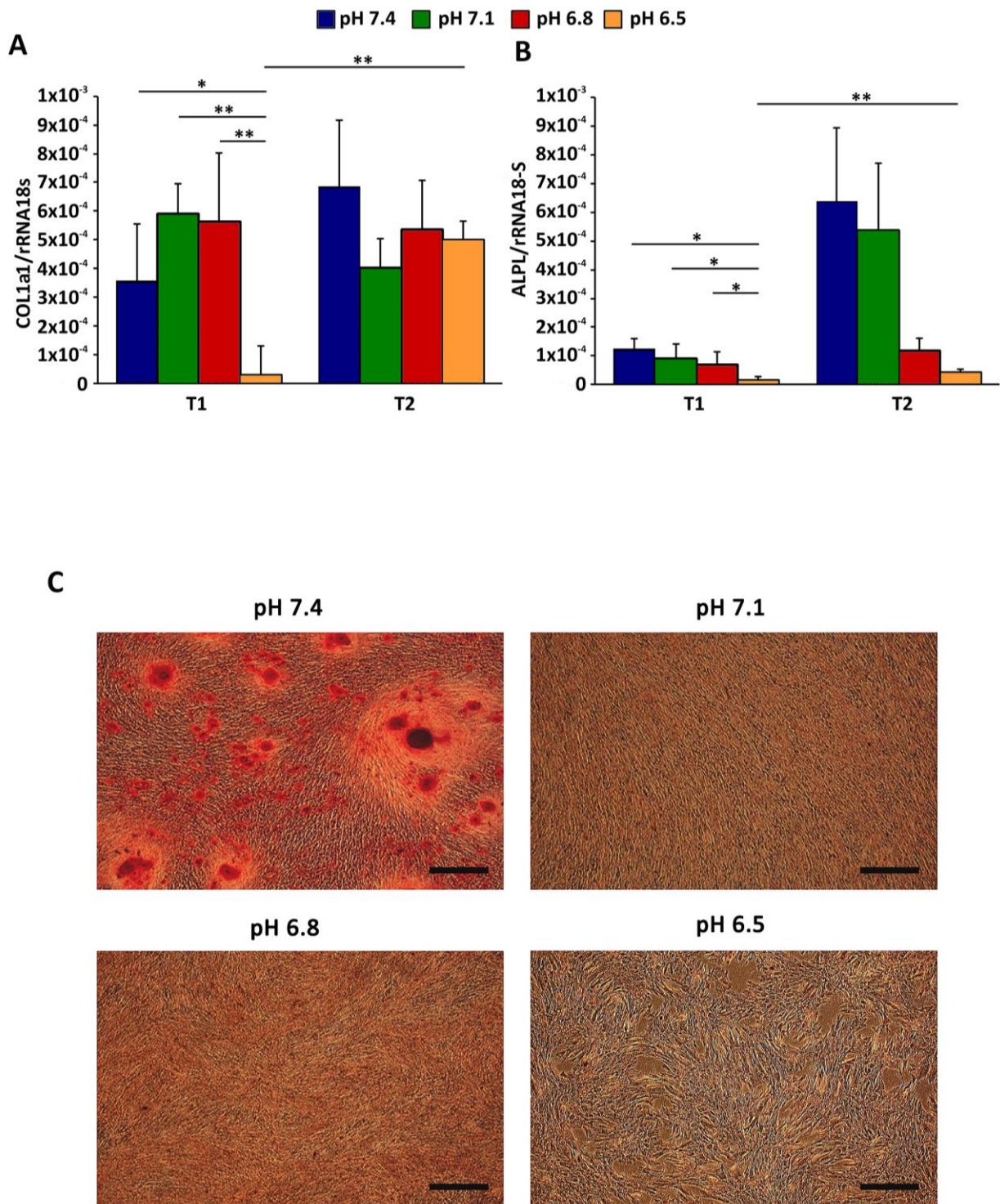
**Figura 21.** L'acidosi extracellulare favorisce lo stato quiescente delle DPSC. (A): la distribuzione del ciclo cellulare delle DPSC sincronizzate ai diversi pH, totale di tre esperimenti, \* $p<0.05$ . (B): diametro ( $\mu\text{m}$ ) delle DPSC mantenute nei mezzi di coltura ai diversi pH. Media di tre citocentrifugati in triplicato, \*\* $p<0.01$ , \* $p<0.05$

Successivamente abbiamo analizzato il diametro cellulare per distinguere le cellule nella fase G0 Alert, una fase della quiescenza delle cellule staminali (256) caratterizzata dalla propensione delle cellule a riprendere tempestivamente il ciclo cellulare. Dopo il trattamento col pH acido, la popolazione cellulare G0 Alert aumentava significativamente, come dimostrato dall'aumento del diametro cellulare ( $p=0.0062$  per pH 6.5 vs pH 7.1 e pH 7.4;  $p=0.0495$  per pH 6.8 vs pH 7.1 e pH 7.4) (Figura 21 B).

## ***Differenziamento osteogenico***

Per determinare se il pH extracellulare influisce sul differenziamento osteogenico delle DPSC sincronizzate, abbiamo valutato l'espressione di due geni implicati nella deposizione della matrice minerale, COL1A1 e ALPL. Dopo 7 giorni (T1) di trattamento con terreno di coltura a pH 6.5 addizionato di fattori pro-osteogenici, l'espressione dei geni analizzati diminuiva significativamente (Figura 22 A-B). Infatti, sia il COL1A1 sia l'ALPL erano significativamente down-regolati a pH 6.5 rispetto al pH 6.8, pH 7.1 e pH 7.4 (COL1A1:  $p=0,0039$  per pH 6.5 vs pH 6.8 e pH 7.1;  $p=0,0495$  per pH 6.5 vs pH 7.4; ALPL:  $p=0,0250$  per pH 6.5 vs pH 6.8;  $p=0,0104$  per pH 6.5 vs pH 7.1 e pH 7.4). Il decremento dell'espressione del COL1A1 e ALPL a pH 6.5 era temporaneo, poiché entrambi i geni aumentavano significativamente dopo 14 giorni (T2) (COL1A1 T1 vs T2  $p=0,0019$ ; ALPL T1 vs T2  $p=0,0098$ ).

Poiché i geni precedentemente analizzati sono implicati nella deposizione della matrice extracellulare nel processo di minerizzazione, abbiamo saggiato l'effetto del pH locale sulla deposizione *in vitro* di noduli minerali. Dopo aver addizionato il  $\beta$ -glicerofosfato al terreno di coltura abbiamo osservato quotidianamente la coltura, e al termine dei 21 giorni (176), abbiamo eseguito la colorazione con rosso di alizarina. Come dimostrato nella figura 22 C, la deposizione di noduli minerali era rilevabile solo nelle DPSC mantenute a pH tamponato (pH 7.4), mentre era inibita a pH acido (pH 6.5 e pH 6.8).



**Figura 22.** Il pH extracellulare interferisce col differenziamento osteogenico e la mineralizzazione delle DPSC. (A), (B): Real Time PCR per COL1A1 e ALPL nelle DPSC mantenute ai differenti pH per 7 giorni (T1) e 14 giorni (T2). I risultati sono espressi come media  $\pm$  SEM del rapporto tra il “gene di interesse” e rRNA 18s. Media di tre esperimenti individuali seminati in duplicato, \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ . (C): Immagini rappresentative dei noduli minerali delle DPSC coltivate ai diversi pH, marcati con rosso di alizarina dopo 21 giorni, barra= 500  $\mu$ m, ingrandimento 4X.



## DISCUSSIONE

Il pH acido interstiziale può caratterizzare diverse condizioni patologiche (202, 204-205) e i tessuti con vascolarizzazione compromessa. Anche nelle fratture, il pH dei fluidi interstiziali contigui all'area di distruzione dei vasi sanguigni è acido (207).

Nel processo di riparazione ossea le MSC sono elementi essenziali che possono contribuire alla guarigione ossea direttamente poiché sono precursori degli osteoblasti o tramite effetti indiretti, secernendo citochine e fattori di crescita che modulano la vascolarizzazione e la risposta infiammatoria (226). Pertanto, l'infusione di MSC rappresenta un approccio terapeutico volto a favorire la guarigione delle fratture (211). Tuttavia, il successo delle strategie rigenerative potrebbe essere ostacolato da un microambiente extracellulare inadeguato (257).

È stato dimostrato che il pH extracellulare è capace di modulare molteplici processi biologici, quali la proliferazione (258), l'efficienza clonale (259), le funzioni immunitarie (260), il fenotipo delle cellule staminali tumorali (261), l'angiogenesi, l'invasione e la chemioresistenza nel cancro (262-263).

I valori di pH dei fluidi interstiziali tipici delle malattie infiammatorie (204) e dei tumori solidi vanno da pH 6.0 a pH 7.0 (205). Tuttavia anche le fratture ossee sono correlate con l'interruzione della vascolarizzazione, portando ad uno stato di ipossia con un cambiamento del metabolismo cellulare verso la glicolisi anaerobia associata all'accumulo di acido lattico. Pertanto l'acidosi extracellulare si può sviluppare nelle prime fasi della frattura.

Per saggiare la nostra ipotesi, abbiamo usato il mezzo di coltura a tre definiti valori di pH acido (6.5, 6.8 e 7.1), riferibili alle malattie menzionate in precedenza, e il mezzo di coltura convenzionale a pH 7.4 per riprodurre un contesto fisiologico.

Per valutare lo stato di staminalità delle DPSC e delle BM-MS, abbiamo effettuato il saggio di formazione degli sferoidi, associati anche nelle MSC a un fenotipo staminale con un ritardo della senescenza replicativa (264-265). Abbiamo dimostrato che il numero delle sfere aumenta significativamente con i pH extracellulari acidi, con una diminuzione significativa del loro volume. L'aumentata staminalità nelle DPSC

mantenute a pH acido è stata confermata dall'induzione dell'espressione di geni di staminalità, quali SOX2, OCT4, KLF4 e c-MYC (266-267).

In particolare, livelli dei fattori di trascrizione SOX2 e OCT4 significativamente aumentati sono stati osservati nelle DPSC mantenute per 7 giorni a pH 6.5 e pH 6.8 rispetto alle cellule coltivate a pH 7.4. Inoltre, KLF4 e c-MYC erano significativamente aumentati a pH acido (6.5). Il significativo aumento di SOX2 e OCT4 a pH 6.5 è stato confermato anche in un ulteriore modello di MSC, le BM-MSC, inoltre l'espressione di KLF4 era aumentata a pH 6.5 e pH 7.1, benchè le differenze non erano statisticamente significative. Diversamente, nelle BM-MSC i livelli di c-MYC non erano influenzati significativamente dal pH extracellulare.

Tutti i risultati precedentemente menzionati hanno confermato l'ipotesi che lo stress acido è un regolatore del fenotipo staminale delle MSC. Vale la pena di ricordare che l'over-espressione dei fattori di trascrizione precedentemente analizzati induce la riprogrammazione delle cellule somatiche nelle cellule IPs (268). Pertanto, i nostri risultati indicano una similitudine, almeno per quanto riguarda l'espressione dei geni di staminalità, tra le cellule staminali embrionali e le cellule staminali adulte mantenute a pH acido (6.5).

Inoltre, poiché le DPSC derivano dall'ectomesenchima della cresta neurale, l'espressione dei marcatori neurali, come la nestina e il p75/NGFR risulta ridotta durante il processo di differenziamento (269-272). Abbiamo osservato un significativo aumento dell'espressione di nestina e un incremento dei livelli di p75/NGFR nelle DPSC mantenute a pH acido 6.5. Questi dati confermano la relazione tra acidosi locale e lo stato di staminalità delle DPSC.

Abbiamo anche dimostrato l'evidenza dell'effetto inibitorio dell'acidosi extracellulare sulla proliferazione delle DPSC. Infatti, il numero delle DPSC, quantificato tramite eritrosina B dopo 7 giorni di coltura, era significativamente diminuito ai valori di pH acido.

Questo risultato è in accordo con l'analisi del ciclo cellulare e il Ki67 index. Il ki67, è una proteina nucleare, strettamente associata alla proliferazione cellulare (273). La percentuale dei nuclei positivi al Ki67 è risultata significativamente più bassa nelle DPSC mantenute a pH acido.

Tuttavia, la percentuale della popolazione cellulare nella fase G0 del ciclo cellulare era significativamente maggiore quando le DPSC sincronizzate erano mantenute a pH acido (6.5 e 6.8) rispetto alle cellule mantenute a pH fisiologico (7.4).

Recentemente, Rodgers e colleghi (256) hanno descritto una nuova fase di quiescenza del ciclo cellulare delle cellule staminali, chiamata G0 Alert, caratterizzata da cellule di dimensioni maggiori capaci di entrare e completare il ciclo cellulare più velocemente.

La transizione dallo stato quiescente, la fase G0, a una fase del ciclo cellulare attiva è peculiare per le capacità rigenerative delle MSC. La fase G0 Alert è stata correlata con la capacità delle cellule staminali di rispondere rapidamente in condizione di lesione.

Per approfondire la fase G0 Alert nel nostro modello cellulare, abbiamo misurato il diametro delle DPSC mantenute ai diversi livelli di pH extracellulare. Abbiamo osservato che le dimensioni erano significativamente maggiori a pH acido. Pertanto abbiamo ipotizzato che ai bassi valori di pH, la crescita cellulare era inibita e lo stato quiescente era favorito, ma le DPSC in seguito all'insulto esterno entrano in uno stato di allerta e sono pronte a reagire in caso di insulto esterno. Lo stato quiescente è utilizzato dalle cellule staminali per preservare le loro caratteristiche funzionali chiave (274), ma l'aumento della percentuale delle cellule nella fase G0 Alert garantisce una efficiente e rapida reazione al danno.

Infine, i nostri risultati hanno confermato l'effetto negativo dell'acidosi extracellulare sull'attività mineralizzante delle DPSC. Infatti, a pH acido abbiamo dimostrato un significativo decremento dell'espressione dei geni correlati all'osteogenesi, nella fattispecie COL1A1 e ALPL. La down-regolazione del COL1A1 è in accordo con dati precedentemente pubblicati (275-276). La fosfatasi alcalina (ALP) è un enzima cruciale durante il processo di mineralizzazione in quanto è responsabile dell'aumento del fosfato inorganico (224). Poiché l'optimum biochimico per l'attività della ALP è il pH alcalino, molteplici studi hanno già dimostrato un effetto inibitorio dell'acidosi locale sull'attività dell'enzima (277). In questo studio abbiamo invece dimostrato anche la diminuzione dell'espressione genica dell'ALPL a pH acido.

Inoltre, la riduzione del pH del mezzo di coltura interferisce con il processo di mineralizzazione poiché come altri autori abbiamo dimostrato una minore formazione di noduli minerali in presenza di acidosi extracellulare (278).

Tali risultati evidenziano una stretta correlazione tra l'inibizione del differenziamento osteogenico delle MSC e il pH acido del microambiente extracellulare.

Newman e colleghi (212) hanno rilevato acidosi locale persistente nelle pseudartrosi e nelle infezioni ossee, suggerendo che la completa guarigione ossea necessita di una variazione del microambiente da acido ad alcalino.

In conclusione, i nostri risultati forniscono un'evidenza consistente sul mantenimento dello stato di staminalità delle MSC da parte del microambiente acido, aumentando l'espressione dei geni di staminalità e favorendo lo stato quiescente del ciclo cellulare. Inoltre l'acidosi locale mostra un impatto negativo sui processi di osteogenesi e di mineralizzazione.

Questi risultati suggeriscono che durante le prime fasi della guarigione di una frattura caratterizzate dall'acidosi, le MSC reclutate nel sito della lesione sono mantenute in uno stato indifferenziato arricchendo la frazione staminale.

Questo studio ha permesso di approfondire le conoscenze sulla biologia delle MSC in un contesto non fisiologico, riferibile a malattie caratterizzate da una alterata omeostasi acido-base. Tuttavia, il ripristino del pH fisiologico è necessario per ottenere la deposizione di nuovo osso. Per questa ragione, una caratterizzazione adeguata e la modulazione del microambiente extracellulare, in particolare le variazioni di pH devono essere considerati per lo sviluppo di trattamenti per le malattie ossee e di strategie di ingegneria tissutale.

In futuro sarà opportuno esaminare i meccanismi molecolari e metabolici responsabili del mantenimento del fenotipo staminale e dello stato di quiescenza delle MSC.

Infine, sono necessari studi clinici per dimostrare se la modulazione delle variazioni del pH extracellulare può realmente avere impatto negli approcci di medicina rigenerativa in campo ortopedico.

## CONCLUSIONI

I risultati ottenuti nello svolgimento del progetto confermano come le caratteristiche del microambiente possano grandemente influenzare la staminalità e il potenziale differenziativo delle MSC.

Sono state considerate diverse fonti di MSC (midollo osseo, tessuto adiposo intatto, polpa dentale) e studiati gli effetti di basse concentrazioni di ossigeno ( $pO_2 = 2-3\%$ ) e di ioni idrogeno ( $pH < 7.4$ ).

Nelle lesioni ossee che possono trarre vantaggio dalla medicina rigenerativa il microambiente è caratterizzato da una forte ipossia (2-4%), e la tensione di ossigeno è molto inferiore a quella che viene convenzionalmente utilizzata nelle colture cellulari ( $pO_2 = 21\%$ ). Inoltre, lo stato di ipossia che si instaura nei tessuti traumatizzati o con vascolarizzazione compromessa induce un cambiamento del metabolismo cellulare verso la glicolisi anaerobia, con conseguente aumento della produzione di acido lattico e riduzione del pH nei fluidi interstiziali ( $pH < 7.4$ ).

I nostri risultati suggeriscono che le MSC adipose (ASC) trapiantate in un microambiente ipossico possono sopravvivere e differenziarsi. L'ipossia promuove la proliferazione cellulare e il mantenimento della staminalità, determinando quindi un arricchimento del pool cellulare capace di differenziarsi verso la linea osteogenica. Inoltre, se nel microambiente ipossico vengono introdotti stimoli pro-osteogenici, il completamento del processo differenziativo e la mineralizzazione sono accelerati.

Anche lo stress acido può essere considerato un regolatore del fenotipo staminale. I risultati hanno dimostrato che un microambiente acido inibisce la proliferazione delle MSC (DPSC) mantenendole in uno stato di quiescenza transitoria (G0 Alert) in cui le cellule sono in grado di rispondere rapidamente a insulti esterni e garantire un'efficiente e rapida reazione al danno. Tuttavia, valori particolarmente bassi di pH hanno un effetto negativo sull'attività mineralizzante delle DPSC, e il ripristino del pH fisiologico è necessario per ottenere la deposizione di nuovo osso.

In conclusione, i risultati ottenuti possono avere un impatto notevole sull'efficacia clinica delle tecniche di medicina rigenerativa in campo ortopedico. L'applicazione di condizioni di coltura che simulano la fisiopatologia delle malattie ossee ha permesso di chiarire alcuni aspetti rilevanti della biologia delle MSC. La modulazione dello stato di

staminalità e di differenziamento impiegando semplici variazioni di pO<sub>2</sub> e di pH, potrebbe essere una valida strategia anche per l'espansione cellulare *ex vivo* o per la produzione di costrutti di ingegneria tissutale, apportando vantaggi significativi in termini di tempo, costi e manipolazione cellulare.

Studi futuri consentiranno la comprensione dei meccanismi molecolari che intervengono nella modulazione del fenotipo delle MSC in particolari condizioni microambientali.

## BIBLIOGRAFIA

- 1 Till JE, McCulloch EA. Repair processes in irradiated mouse hematopoietic tissue. *Ann N Y Acad Sci.* 1964 Mar 31;114:115-25.
- 2 Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet.* 1970 Oct;3(4):393-403.
- 3 Caplan AL. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* 1991 Sep;9(5):641-50.
- 4 Johnson A, Dorshkind K. Stromal cells in myeloid and lymphoid long-term bone marrow cultures can support multiple hemopoietic lineages and modulate their production of hemopoietic growth factors. *Blood.* 1986 Dec;68(6):1348-54.
- 5 Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999 Apr 2;284(5411):143-7.
- 6 Iyanki T, Hubenak J, Liu J, Chang EI, Beahm EK, Zhang Q. Harvesting technique affects adipose-derived stem cell yield. *Aesthet Surg J.* 2015 May;35(4):467-7.
- 7 Payumo FC, Kim HD, Sherling MA, Smith LP, Powell C, Wang X, Keeping HS, Valentini RF, Vandenburgh HH. Tissue engineering skeletal muscle for orthopaedic applications. *Clin Orthop Relat Res.* 2002 Oct;(403 Suppl):S228-42.
- 8 Khan WS, Hardingham TE. The characterisation of mesenchymal stem cells: a stem cell is not a stem cell is not a stem cell. *J Stem Cells.* 2012;7(2):87-95.
- 9 Verdi J, Tan A, Shoaie-Hassani A, Seifalian AM. Endometrial stem cells in regenerative medicine. *J Biol Eng.* 2014 Aug 1;8:20.
- 10 Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop DJ, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8(4):315-7.
- 11 Leonardi E, Ciapetti G, Baglioni SR, Devescovi V, Baldini N, Granchi D. Osteogenic properties of late adherent subpopulations of human bone marrow stromal cells. *Histochem Cell Biol.* 2009 Nov;132(5):547-57.
- 12 Zhang ZL, Tong J, Lu RN, Scutt AM, Goltzman D, Miao DS. Therapeutic potential of non-adherent BM-derived mesenchymal stem cells in tissue regeneration. *Bone Marrow Transplant.* 2009 Jan;43(1):69-81.
- 13 Bahat-Stroomza M, Barhum Y, Levy YS, Karpov O, Bulvik S, Melamed E, Offen D. Induction of adult human bone marrow mesenchymal stromal cells into functional astrocyte-

like cells: potential for restorative treatment in Parkinson's disease. *J Mol Neurosci*. 2009 Sep;39(1-2):199-210

14 Chen L, He DM, Zhang Y. The differentiation of human placenta-derived mesenchymal stem cells into dopaminergic cells in vitro. *Cell Mol Biol Lett*. 2009;14(3):528-36.

15 Banas A. Purification of adipose tissue mesenchymal stem cells and differentiation toward hepatic-like cells. *Methods Mol Biol*. 2012;826:61-72.

16 Nauta AJ, Kruisselbrink AB, Lurvink E, Willemze R, Fibbe WE. Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34+-derived and monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol*. 2006 Aug 15;177(4):2080-7.

17 Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, Giunti D, Cappiello V, Cazzanti F, Risso M, Gualandi F, Mancardi GL, Pistoia V, Uccelli A. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood*. 2006 Jan 1;107(1):367-72.

18 Mattar P, Bieback K. Comparing the Immunomodulatory Properties of Bone Marrow, Adipose Tissue, and Birth-Associated Tissue Mesenchymal Stromal Cells. *Front Immunol*. 2015 Nov 3;6:560.

19 Duffy MM, Ritter T, Ceredig R, Griffin MD. Mesenchymal stem cell effects on T-cell effector pathways. *Stem Cell Res Ther*. 2011 Aug 11;2(4):34.

20 Rameshwar P. IFN $\gamma$  and B7-H1 in the immunology of mesenchymal stem cells. *Cell Res*. 2008 Aug;18(8):805-6.

21 Consentius C, Reinke P, Volk HD. Immunogenicity of allogeneic mesenchymal stromal cells: what has been seen in vitro and in vivo? *Regen Med*. 2015;10(3):305-15.

22 François M, Romieu-Mourez R, Stock-Martineau S, Boivin MN, Bramson JL, Galipeau J. Mesenchymal stromal cells cross-present soluble exogenous antigens as part of their antigen-presenting cell properties. *Blood*. 2009 Sep 24;114(13):2632-8.

23 Baron F, Lechanteur C, Willems E, Bruck F, Baudoux E, Seidel L, Vanbellinghen JF, Hafraoui K, Lejeune M, Gothot A, Fillet G, Beguin Y. Cotransplantation of mesenchymal stem cells might prevent death from graft-versus-host disease (GVHD) without abrogating graft-versus-tumor effects after HLA-mismatched allogeneic transplantation following nonmyeloablative conditioning. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010 Jun;16(6):838-47.

24 Ciccocioppo R, Bernardo ME, Sgarella A, Maccario R, Avanzini MA, Ubezio C, Minelli A, Alvisi C, Vanoli A, Calliada F, Dionigi P, Perotti C, Locatelli F, Corazza GR. Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in the treatment of fistulising Crohn's disease. *Gut*. 2011 Jun;60(6):788-98.

25 Toubai T, Paczesny S, Shono Y, Tanaka J, Lowler KP, Malter CT, Kasai M, Imamura M. Mesenchymal stem cells for treatment and prevention of graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2009 Dec;4(4):252-9.



- 26 Le Blanc K, Ringdén O. Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience. *J Intern Med*. 2007 Nov;262(5):509-25.
- 27 Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*. 2005 Feb 15;105(4):1815-22.
- 28 Spaggiari GM, Abdelrazik H, Becchetti F, Moretta L. MSCs inhibit monocyte-derived DC maturation and function by selectively interfering with the generation of immature DCs: central role of MSC-derived prostaglandin E2. *Blood*. 2009 Jun 25;113(26):6576-83.
- 29 Kaplan JM, Youd ME, Lodie TA. Immunomodulatory activity of mesenchymal stem cells. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2011 Dec;6(4):297-316.
- 30 Le Blanc K, Tammik L, Sundberg B, Haynesworth SE, Ringdén O. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scand J Immunol*. 2003 Jan;57(1):11-20.
- 31 Ortiz LA, Gambelli F, McBride C, Gaupp D, Baddoo M, Kaminski N, Phinney DG. Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Jul 8;100(14):8407-11.
- 32 D'Agostino B, Sullo N, Siniscalco D, De Angelis A, Rossi F. Mesenchymal stem cell therapy for the treatment of chronic obstructive pulmonary disease. *Expert Opin Biol Ther*. 2010 May;10(5):681-7.
- 33 Kovach TK, Dighe AS, Lobo PI, Cui Q. Interactions between MSCs and immune cells: implications for bone healing. *J Immunol Res*. 2015;2015:752510.
- 34 Tondreau T, Meuleman N, Stamatopoulos B, De Bruyn C, Delforge A, Dejeneffe M, Martiat P, Bron D, Lagneaux L. In vitro study of matrix metalloproteinase/tissue inhibitor of metalloproteinase production by mesenchymal stromal cells in response to inflammatory cytokines: the role of their migration in injured tissues. *Cytotherapy*. 2009;11(5):559-69.
- 35 Dolberg DS, Hollingsworth R, Hertle M, Bissell MJ. Wounding and its role in RSV-mediated tumor formation. *Science*. 1985 Nov 8;230(4726):676-8.
- 36 Butcher EC. Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell*. 1991 Dec 20;67(6):1033-6.
- 37 Dabusti M, Lanza F, Campioni D, Castagnari B, Tieghi A, Moretti S, Punturieri M, De Angeli C, Spanedda R, Ferrazzi E, Castoldi G. CXCR-4 expression on bone marrow CD34+ cells prior to mobilization can predict mobilization adequacy in patients with hematologic malignancies. *J Hematother Stem Cell Res*. 2003 Aug;12(4):425-34.

- 38 Von Andrian UH, Hansell P, Chambers JD, Berger EM, Torres Filho I, Butcher EC, Arfors KE. L-selectin function is required for beta 2-integrin-mediated neutrophil adhesion at physiological shear rates in vivo. *Am J Physiol.* 1992 Oct;263(4 Pt 2):H1034-44.
- 39 Midwood KS, Mao Y, Hsia HC, Valenick LV, Schwarzbauer JE. Modulation of cell-fibronectin matrix interactions during tissue repair. *J Investig Dermatol Symp Proc.* 2006 Sep;11(1):73-8.
- 40 Kucia M, Jankowski K, Reza R, Wysoczynski M, Bandura L, Allendorf DJ, Zhang J, Ratajczak J, Ratajczak MZ. CXCR4-SDF-1 signalling, locomotion, chemotaxis and adhesion. *J Mol Histol.* 2004 Mar;35(3):233-45.
- 41 Kundu M, Javed A, Jeon JP, Horner A, Shum L, Eckhaus M, Muenke M, Lian JB, Yang Y, Nuckolls GH, Stein GS, Liu PP. Cbfbeta interacts with Runx2 and has a critical role in bone development. *Nat Genet.* 2002 Dec;32(4):639-44.
- 42 Sanchez-Gurmaches J, Guertin DA. Adipocyte lineages: tracing back the origins of fat. *Biochim Biophys Acta.* 2014 Mar;1842(3):340-51.
- 43 Oreffo RO, Kusec V, Romberg S, Triffitt JT. Human bone marrow osteoprogenitors express estrogen receptor-alpha and bone morphogenetic proteins 2 and 4 mRNA during osteoblastic differentiation. *J Cell Biochem.* 1999 Dec 1;75(3):382-92.
- 44 Gerstenfeld LC, Barnes GL, Shea CM, Einhorn TA. Osteogenic differentiation is selectively promoted by morphogenetic signals from chondrocytes and synergized by a nutrient rich growth environment. *Connect Tissue Res.* 2003;44 Suppl 1:85-91.
- 45 Kawakami Y, Rodriguez-León J, Izpisua Belmonte JC. The role of TGFbetas and Sox9 during limb chondrogenesis. *Curr Opin Cell Biol.* 2006 Dec;18(6):723-9.
- 46 Gruber HE, Norton HJ, Ingram JA, Hanley EN Jr. The SOX9 transcription factor in the human disc: decreased immunolocalization with age and disc degeneration. *Spine (Phila Pa 1976).* 2005 Mar 15;30(6):625-30.
- 47 Shen B, Wei A, Tao H, Diwan AD, Ma DD. BMP-2 enhances TGF-beta3-mediated chondrogenic differentiation of human bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells in alginate bead culture. *Tissue Eng Part A.* 2009 Jun;15(6):1311-20.
- 48 Kalson NS, Richardson S, Hoyland JA. Strategies for regeneration of the intervertebral disc. *Regen Med.* 2008 Sep;3(5):717-29.
- 49 Tang QQ, Lane MD. Adipogenesis: from stem cell to adipocyte. *Annu Rev Biochem.* 2012;81:715-36.
- 50 Siersbaek R, Nielsen R, Mandrup S. PPARgamma in adipocyte differentiation and metabolism--novel insights from genome-wide studies. *FEBS Lett.* 2010 Aug 4;584(15):3242-9.

- 51 Choi YS, Dusting GJ, Stubbs S, Arunothayaraj S, Han XL, Collas P, Morrison WA, Dilley RJ. Differentiation of human adipose-derived stem cells into beating cardiomyocytes. *J Cell Mol Med*. 2010 Apr;14(4):878-89.
- 52 Hashemian SJ, Kouhnavard M, Nasli-Esfahani E. Mesenchymal Stem Cells: Rising Concerns over Their Application in Treatment of Type One Diabetes Mellitus. *J Diabetes Res*. 2015;2015:675103.
- 53 da Silva Meirelles L, Caplan AI, Nardi NB. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2008 Sep;26(9):2287-99.
- 54 Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, Weber JM, Olson DP, Knight MC, Martin RP, Schipani E, Divieti P, Bringham FR, Milner LA, Kronenberg HM, Scadden DT. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature*. 2003 Oct 23;425(6960):841-
- 55 Brighton CT, Lorch DG, Kupcha R, Reilly TM, Jones AR, Woodbury RA 2nd. The pericyte as a possible osteoblast progenitor cell. *Clin Orthop Relat Res*. 1992 Feb;(275):287-99.
- 56 Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen CW, Corselli M, Park TS, Andriolo G, Sun B, Zheng B, Zhang L, Norotte C, Teng PN, Traas J, Schugar R, Deasy BM, Badylak S, Buhring HJ, Jacobino JP, Lazzari L, Huard J, Péault B. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell*. 2008 Sep 11;3(3):301-13.
- 57 Méndez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, Mazloom AR, Macarthur BD, Lira SA, Scadden DT, Ma'ayan A, Enikolopov GN, Frenette PS. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature*. 2010 Aug 12;466(7308):829-34.
- 58 Wright DE, Wagers AJ, Gulati AP, Johnson FL, Weissman IL. Physiological migration of hematopoietic stem and progenitor cells. *Science*. 2001 Nov 30;294(5548):1933-6.
- 59 Muraglia A, Cancedda R, Quarto R. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *J Cell Sci*. 2000 Apr;113 ( Pt 7):1161-6.
- 60 Baxter MA, Wynn RF, Jowitt SN, Wraith JE, Fairbairn LJ, Bellantuono I. Study of telomere length reveals rapid aging of human marrow stromal cells following in vitro expansion. *Stem Cells*. 2004;22(5):675-82.
- 61 Redaelli S, Bentivegna A, Foudah D, Miloso M, Redondo J, Riva G, Baronchelli S, Dalprà L, Tredici G. From cytogenomic to epigenomic profiles: monitoring the biologic behavior of in vitro cultured human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther*. 2012 Nov 20;3(6):47.
- 62 Wagner W, Horn P, Castoldi M, Diehlmann A, Bork S, Saffrich R, Benes V, Blake J, Pfister S, Eckstein V, Ho AD. Replicative senescence of mesenchymal stem cells: a continuous and organized process. *PLoS One*. 2008 May 21;3(5):e2213.

- 63 Neuhuber B, Swanger SA, Howard L, Mackay A, Fischer I. Effects of plating density and culture time on bone marrow stromal cell characteristics. *Exp Hematol*. 2008 Sep;36(9):1176-85.
- 64 Shahdadfar A, Frønsdal K, Haug T, Reinholt FP, Brinchmann JE. In vitro expansion of human mesenchymal stem cells: choice of serum is a determinant of cell proliferation, differentiation, gene expression, and transcriptome stability. *Stem Cells*. 2005 Oct;23(9):1357-66.
- 65 Stewart K, Monk P, Walsh S, Jefferiss CM, Letchford J, Beresford JN. STRO-1, HOP-26 (CD63), CD49a and SB-10 (CD166) as markers of primitive human marrow stromal cells and their more differentiated progeny: a comparative investigation in vitro. *Cell Tissue Res*. 2003 Sep;313(3):281-90.
- 66 Gronthos S, Zannettino AC, Hay SJ, Shi S, Graves SE, Kortesisidis A, Simmons PJ. Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J Cell Sci*. 2003 May 1;116(Pt 9):1827-35.
- 67 Young C, Jarrell BE, Hoying JB, Williams SK. A porcine model for adipose tissue-derived endothelial cell transplantation. *Cell Transplant*. 1992;1(4):293-8.
- 68 Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*. 2002 Dec;13(12):4279-95.
- 69 Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 2001 Apr;7(2):211-28.
- 70 Boquest AC, Collas P. Obtaining freshly isolated and cultured mesenchymal stem cells from human adipose tissue. *Methods Mol Biol*. 2012;879:269-78.
- 71 Mizuno H, Tobita M, Uysal AC. Concise review: Adipose-derived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine. *Stem Cells*. 2012 May;30(5):804-10.
- 72 Jurgens WJ, Oedayrajsingh-Varma MJ, Helder MN, Zandiehoulabi B, Schouten TE, Kuik DJ, Ritt MJ, van Milligen FJ. Effect of tissue-harvesting site on yield of stem cells derived from adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Cell Tissue Res*. 2008 Jun;332(3):415-26.
- 73 Matsumoto D, Sato K, Gonda K, Takaki Y, Shigeura T, Sato T, Aiba-Kojima E, Iizuka F, Inoue K, Suga H, Yoshimura K. Cell-assisted lipotransfer: supportive use of human adipose-derived cells for soft tissue augmentation with lipoinjection. *Tissue Eng*. 2006 Dec;12(12):3375-82.
- 74 Wang WZ, Fang XH, Williams SJ, Stephenson LL, Baynosa RC, Wong N, Khiabani KT, Zamboni WA. Analysis for apoptosis and necrosis on adipocytes, stromal vascular fraction,

and adipose-derived stem cells in human lipoaspirates after liposuction. *Plast Reconstr Surg*. 2013 Jan;131(1):77e-85e.

75 Yoshimura K, Shigeura T, Matsumoto D, Sato T, Takaki Y, Aiba-Kojima E, Sato K, Inoue K, Nagase T, Koshima I, Gonda K. Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates. *J Cell Physiol*. 2006 Jul;208(1):64-76.

76 Murohara T. Autologous adipose tissue as a new source of progenitor cells for therapeutic angiogenesis. *J Cardiol*. 2009 Apr;53(2):155-63.

77 Bunnell BA, Estes BT, Guilak F, Gimble JM. Differentiation of adipose stem cells. *Methods Mol Biol*. 2008;456:155-71.

78 Bieback K. Platelet lysate as replacement for fetal bovine serum in mesenchymal stromal cell cultures. *Transfus Med Hemother*. 2013 Oct;40(5):326-35.

79 Gimble JM, Bunnell BA, Chiu ES, Guilak F. Concise review: Adipose-derived stromal vascular fraction cells and stem cells: let's not get lost in translation. *Stem Cells*. 2011 May;29(5):749-54.

80 Papaccio G. Human dental pulp stem cells: from biology to clinical applications. *J Exp Zool B Mol Dev Evol*. 2009 Jul 15;312B(5):408-15

81 d'Aquino R, De Rosa A, Laino G, Caruso F, Guida L, Rullo R, Checchi V, Laino L, Tirino V, Papaccio G. Human dental pulp stem cells: from biology to clinical applications. *J Exp Zool B Mol Dev Evol*. 2009 Jul 15;312B(5):408-15.

82 Young F, Sloan A, Song B. Dental pulp stem cells and their potential roles in central nervous system regeneration and repair. *J Neurosci Res*. 2013 Nov;91(11):1383-93.

83 Dimitrova-Nakov S, Baudry A, Harichane Y, Kellermann O, Goldberg M. Pulp stem cells: implication in reparative dentin formation. *J Endod*. 2014 Apr;40(4 Suppl):S13-8.

84 Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, Shi S. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 May 13;100(10):5807-12.

85 Laino G, d'Aquino R, Graziano A, Lanza V, Carinci F, Naro F, Pirozzi G, Papaccio G. A new population of human adult dental pulp stem cells: a useful source of living autologous fibrous bone tissue (LAB). *J Bone Miner Res*. 2005 Aug;20(8):1394-402.

86 Lee S, An S, Kang TH, Kim KH, Chang NH, Kang S, Kwak CK, Park HS. Comparison of mesenchymal-like stem/progenitor cells derived from supernumerary teeth with stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Regen Med*. 2011 Nov;6(6):689-99.

87 d'Aquino R, Graziano A, Sampaolesi M, Laino G, Pirozzi G, De Rosa A, Papaccio G. Human postnatal dental pulp cells co-differentiate into osteoblasts and endotheliocytes: a

pivotal synergy leading to adult bone tissue formation. *Cell Death Differ.* 2007 Jun;14(6):1162-71.

88 Almushayt A, Narayanan K, Zaki AE, George A. Dentin matrix protein 1 induces cytodifferentiation of dental pulp stem cells into odontoblasts. *Gene Ther.* 2006 Apr;13(7):611-20.

89 Arthur A, Shi S, Zannettino AC, Fujii N, Gronthos S, Koblar SA. Implanted adult human dental pulp stem cells induce endogenous axon guidance. *Stem Cells.* 2009 Sep;27(9):2229-37.

90 d'Aquino R, Graziano A, Sampaolesi M, Laino G, Pirozzi G, De Rosa A, Papaccio G. Human postnatal dental pulp cells co-differentiate into osteoblasts and endotheliocytes: a pivotal synergy leading to adult bone tissue formation. *Cell Death Differ.* 2007 Jun;14(6):1162-71.

91 Alge DL, Zhou D, Adams LL, Wyss BK, Shadday MD, Woods EJ, Gabriel Chu TM, Goebel WS. Donor-matched comparison of dental pulp stem cells and bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a rat model. *J Tissue Eng Regen Med.* 2010 Jan;4(1):73-81.

92 Spath L, Rotilio V, Alessandrini M, Gambaro G, De Angelis L, Mancini M, Mitsiadis TA, Vivarelli E, Naro F, Filippini A, Papaccio G. Explant-derived human dental pulp stem cells enhance differentiation and proliferation potentials. *J Cell Mol Med.* 2010 Jun;14(6B):1635-44.

93 Hilkens P, Gervois P, Fanton Y, Vanormelingen J, Martens W, Struys T, Politis C, Lambrichts I, Bronckaers A. Effect of isolation methodology on stem cell properties and multilineage differentiation potential of human dental pulp stem cells. *Cell Tissue Res.* 2013 Jul;353(1):65-78.

94 Ledesma-Martínez E, Mendoza-Núñez VM, Santiago-Osorio E. Mesenchymal Stem Cells Derived from Dental Pulp: A Review. *Stem Cells Int.* 2016;2016:4709572.

95 Yang X, van der Kraan PM, van den Dolder J, Walboomers XF, Bian Z, Fan M, Jansen JA. STRO-1 selected rat dental pulp stem cells transfected with adenoviral-mediated human bone morphogenetic protein 2 gene show enhanced odontogenic differentiation. *Tissue Eng.* 2007 Nov;13(11):2803-12.

96 Laino G, Graziano A, d'Aquino R, Pirozzi G, Lanza V, Valiante S, De Rosa A, Naro F, Vivarelli E, Papaccio G. An approachable human adult stem cell source for hard-tissue engineering. *J Cell Physiol.* 2006 Mar;206(3):693-701.

97 Jo YY, Lee HJ, Kook SY, Choung HW, Park JY, Chung JH, Choung YH, Kim ES, Yang HC, Choung PH. Isolation and characterization of postnatal stem cells from human dental tissues. *Tissue Eng.* 2007 Apr;13(4):767-73.

98 Pivoriūnas A, Surovas A, Borutinskaite V, Matuzevicius D, Treigyte G, Savickiene J, Tunaitis V, Aldonyte R, Jarmalaviciuote A, Suriakaite K, Liutkevicius E, Venalis A,

Navakauskas D, Navakauskiene R, Magnusson KE. Proteomic analysis of stromal cells derived from the dental pulp of human exfoliated deciduous teeth. *Stem Cells Dev.* 2010 Jul;19(7):1081-93.

99 Liu L, Wu L, Wei X, Ling J. Induced overexpression of Oct4A in human dental pulp cells enhances pluripotency and multilineage differentiation capability. *Stem Cells Dev.* 2015 Apr 15;24(8):962-72.

100 Liu L, Ling J, Wei X, Wu L, Xiao Y. Stem cell regulatory gene expression in human adult dental pulp and periodontal ligament cells undergoing odontogenic/osteogenic differentiation. *J Endod.* 2009 Oct;35(10):1368-76.

101 Hsu SH, Chang JC. The static magnetic field accelerates the osteogenic differentiation and mineralization of dental pulp cells. *Cytotechnology.* 2010 Apr;62(2):143-55.

102 Balic A, Aguila HL, Caimano MJ, Francone VP, Mina M. Characterization of stem and progenitor cells in the dental pulp of erupted and unerupted murine molars. *Bone.* 2010 Jun;46(6):1639-51.

103 Gronthos S, Brahim J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, DenBesten P, Robey PG, Shi S. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res.* 2002 Aug;81(8):531-5.

104 Nosrat IV, Smith CA, Mullally P, Olson L, Nosrat CA. Dental pulp cells provide neurotrophic support for dopaminergic neurons and differentiate into neurons in vitro; implications for tissue engineering and repair in the nervous system. *Eur J Neurosci.* 2004 May;19(9):2388-98.

105 Marchionni C, Bonsi L, Alviano F, Lanzoni G, Di Tullio A, Costa R, Montanari M, Tazzari PL, Ricci F, Pasquinelli G, Orrico C, Grossi A, Prati C, Bagnara GP. Angiogenic potential of human dental pulp stromal (stem) cells. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2009 Jul-Sep;22(3):699-706.

106 Al-Habib M, Yu Z, Huang GT. Small molecules affect human dental pulp stem cell properties via multiple signaling pathways. *Stem Cells Dev.* 2013 Sep 1;22(17):2402-13.

107 Papaccio G, Graziano A, d'Aquino R, Graziano MF, Pirozzi G, Menditti D, De Rosa A, Carinci F, Laino G. Long-term cryopreservation of dental pulp stem cells (SBP-DPSCs) and their differentiated osteoblasts: a cell source for tissue repair. *J Cell Physiol.* 2006 Aug;208(2):319-25.

108 Lee RH, Kim B, Choi I, Kim H, Choi HS, Suh K, Bae YC, Jung JS. Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. *Cell Physiol Biochem.* 2004;14(4-6):311-24.

109 Schrepfer S, Deuse T, Reichenspurner H, Fischbein MP, Robbins RC, Pelletier MP. Stem cell transplantation: the lung barrier. *Transplant Proc.* 2007 Mar;39(2):573-6.

- 110 Fischer UM, Harting MT, Jimenez F, Monzon-Posadas WO, Xue H, Savitz SI, Laine GA, Cox CS Jr. Pulmonary passage is a major obstacle for intravenous stem cell delivery: the pulmonary first-pass effect. *Stem Cells Dev.* 2009 Jun;18(5):683-92.
- 111 Golpanian S, Schulman IH, Ebert RF, Heldman AW, DiFede DL, Yang PC, Wu JC, Bolli R, Perin EC, Moyé L, Simari RD, Wolf A, Hare JM. Concise Review: Review and Perspective of Cell Dosage and Routes of Administration From Preclinical and Clinical Studies of Stem Cell Therapy for Heart Disease. *Stem Cells Transl Med.* 2016 Feb;5(2):186-91
- 112 Chen X, Li Y, Wang L, Katakowski M, Zhang L, Chen J, Xu Y, Gautam SC, Chopp M. Ischemic rat brain extracts induce human marrow stromal cell growth factor production. *Neuropathology.* 2002 Dec;22(4):275-9.
- 113 Tondreau T, Dejeneffe M, Meuleman N, Stamatopoulos B, Delforge A, Martiat P, Bron D, Lagneaux L. Gene expression pattern of functional neuronal cells derived from human bone marrow mesenchymal stromal cells. *BMC Genomics.* 2008 Apr 11;9:166.
- 114 Trzaska KA, Reddy BY, Munoz JL, Li KY, Ye JH, Rameshwar P. Loss of RE-1 silencing factor in mesenchymal stem cell-derived dopamine progenitors induces functional maturity. *Mol Cell Neurosci.* 2008 Oct;39(2):285-90.
- 115 Masereeuw R. Contribution of bone marrow-derived cells in renal repair after acute kidney injury. *Minerva Urol Nefrol.* 2009 Dec;61(4):373-84.
- 116 Herrera MB, Bussolati B, Bruno S, Morando L, Mauriello-Romanazzi G, Sanavio F, Stamenkovic I, Biancone L, Camussi G. Exogenous mesenchymal stem cells localize to the kidney by means of CD44 following acute tubular injury. *Kidney Int.* 2007 Aug;72(4):430-41.
- 117 De Miguel MP, Fuentes-Julián S, Blázquez-Martínez A, Pascual CY, Aller MA, Arias J, Arnalich-Montiel F. Immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells: advances and applications. *Curr Mol Med.* 2012 Jun;12(5):574-91.
- 118 Semedo P, Correa-Costa M, Antonio Cenedeze M, Maria Avancini Costa Malheiros D, Antonia dos Reis M, Shimizu MH, Seguro AC, Pacheco-Silva A, Saraiva Camara NO. Mesenchymal stem cells attenuate renal fibrosis through immune modulation and remodeling properties in a rat remnant kidney model. *Stem Cells.* 2009 Dec;27(12):3063-73.
- 119 Horwitz EM, Gordon PL, Koo WK, Marx JC, Neel MD, McNall RY, Muul L, Hofmann T. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Jun 25;99(13):8932-7.
- 120 Otsuru S, Gordon PL, Shimono K, Jethva R, Marino R, Phillips CL, Hofmann TJ, Veronesi E, Dominici M, Iwamoto M, Horwitz EM. Transplanted bone marrow mononuclear cells and MSCs impart clinical benefit to children with osteogenesis imperfecta through different mechanisms. *Blood.* 2012 Aug 30;120(9):1933-41.



- 121 Gangji V, Hauzeur JP, Matos C, De Maertelaer V, Toungouz M, Lambermont M. Treatment of osteonecrosis of the femoral head with implantation of autologous bone-marrow cells. A pilot study. *J Bone Joint Surg Am.* 2004 Jun;86-A(6):1153-60.
- 122 Jäger M, Jelinek EM, Wess KM, Scharfstädt A, Jacobson M, Kevy SV, Krauspe R. Bone marrow concentrate: a novel strategy for bone defect treatment. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2009 Jan;4(1):34-43.
- 123 Warnke PH, Springer IN, Wiltfang J, Acil Y, Eufinger H, Wehmöller M, Russo PA, Bolte H, Sherry E, Behrens E, Terheyden H. Growth and transplantation of a custom vascularised bone graft in a man. *Lancet.* 2004 Aug 28-Sep 3;364(9436):766-70.
- 124 Ciapetti G, Granchi D, Baldini N. The combined use of mesenchymal stromal cells and scaffolds for bone repair. *Curr Pharm Des.* 2012;18(13).
- 125 Fekete N, Gadelorge M, Fürst D, Maurer C, Dausend J, Fleury-Cappellesso S, Mailänder V, Lotfi R, Ignatius A, Sensebé L, Bourin P, Schrezenmeier H, Rojewski MT. Platelet lysate from whole blood-derived pooled platelet concentrates and apheresis-derived platelet concentrates for the isolation and expansion of human bone marrow mesenchymal stromal cells: production process, content and identification of active components. *Cytotherapy.* 2012;14:540-54
- 126 Downey PA, Siegel MI. Bone biology and the clinical implications for osteoporosis. *Phys Ther.* 2006 Jan;86(1):77- 91.
- 127 Kwan MD, Slater BJ, Wan DC, Longaker MT. Cell-based therapies for skeletal regenerative medicine. *Hum Mol Genet.* 2008 Apr 15;17(R1):R93-8
- 128 Einhorn TA. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res.* 1998 Oct;(355 Suppl):S7-21.
- 129 Kon T, Cho TJ, Aizawa T, Yamazaki M, Nooh N, Graves D, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Expression of osteoprotegerin, receptor activator of NF-kappaB ligand (osteoprotegerin ligand) and related proinflammatory cytokines during fracture healing. *J Bone Miner Res.* 2001 Jun;16(6):1004-14.
- 130 Pape HC, Marcucio R, Humphrey C, Colnot C, Knobe M, Harvey EJ. Trauma-induced inflammation and fracture healing. *J Orthop Trauma.* 2010 Sep;24(9):522-5.
- 131 Shea CM, Edgar CM, Einhorn TA, Gerstenfeld LC. BMP treatment of C3H10T1/2 mesenchymal stem cells induces both chondrogenesis and osteogenesis. *J Cell Biochem.* 2003 Dec 15;90(6):1112-27.
- 132 Li G, White G, Connolly C, Marsh D. Cell proliferation and apoptosis during fracture healing. *J Bone Miner Res.* 2002 May;17(5):791-9.

- 133 Markel MD, Wikenheiser MA, Chao EY. A study of fracture callus material properties: relationship to the torsional strength of bone. *J Orthop Res.* 1990 Nov;8(6):843-50.
- 134 Bianco P, Cancedda FD, Riminucci M, Cancedda R. Bone formation via cartilage models: the "borderline" chondrocyte. *Matrix Biol.* 1998 Jul;17(3):185-92.
- 135 Maes C. Role and regulation of vascularization processes in endochondral bones. *Calcif Tissue Int.* 2013 Apr;92(4):307-23.
- 136 Ikeda K, Takeshita S. Factors and mechanisms involved in the coupling from bone resorption to formation: how osteoclasts talk to osteoblasts. *J Bone Metab.* 2014 Aug;21(3):163-7.
- 137 Eriksen EF. Cellular mechanisms of bone remodeling. *Rev Endocr Metab Disord.* 2010 Dec;11(4):219-27. doi: 10.1007/s11154-010-9153-1.
- 138 Matsuo K, Irie N. Osteoclast-osteoblast communication. *Arch Biochem Biophys.* 2008 May 15;473(2):201-9. doi: 10.1016/j.abb.2008.03.027. Epub 2008 Mar 29.
- 139 Siddappa R, Fernandes H, Liu J, van Blitterswijk C, de Boer J. The response of human mesenchymal stem cells to osteogenic signals and its impact on bone tissue engineering. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2007 Sep;2(3):209-20.
- 140 Baglìo SR, Devescovi V, Granchi D, Baldini N. MicroRNA expression profiling of human bone marrow mesenchymal stem cells during osteogenic differentiation reveals Osterix regulation by miR-31. *Gene.* 2013 Sep 15;527(1):321-31.
- 141 Kalfas IH. Principles of bone healing. *Neurosurg Focus.* 2001 Apr 15;10(4):E1.
- 142 Augello A, De Bari C. The regulation of differentiation in mesenchymal stem cells. *Hum Gene Ther.* 2010;21.
- 143 Veeman MT, Axelrod JD, Moon RT. A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling. *Dev Cell.* 2003 Sep;5(3):367-77.
- 144 Bodine PV. Wnt signaling control of bone cell apoptosis. *Cell Res.* 2008 Feb;18(2):248-53. doi: 10.1038/cr.2008.13.
- 145 . Matsuzaki E, Takahashi-Yanaga F, Miwa Y, Hirata M, Watanabe Y, Sato N, Morimoto S, Hirofuji T, Maeda K, Sasaguri T. Differentiation-inducing factor-1 alters canonical Wnt signaling and suppresses alkaline phosphatase expression in osteoblast-like cell lines. *J Bone Miner Res.* 2006 Aug;21(8):1307-16.
- 146 Tsumaki N, Yoshikawa H. The role of bone morphogenetic proteins in endochondral bone formation. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005 Jun;16(3):279-85.

- 147 Cao X, Chen D. The BMP signaling and in vivo bone formation. *Gene*. 2005 Aug 29;357(1):1-8.
- 148 Miyazono K, Maeda S, Imamura T. Coordinate regulation of cell growth and differentiation by TGF-beta superfamily and Runx proteins. *Oncogene*. 2004 May 24;23(24):4232-7.
- 149 Chau JF, Leong WF, Li B. Signaling pathways governing osteoblast proliferation, differentiation and function. *Histol Histopathol*. 2009 Dec;24(12):1593-606.
- 150 Engin F, Lee B. NOTCHing the bone: insights into multi-functionality. *Bone*. 2010 Feb;46(2):274-80. doi: 10.1016/j.bone.2009.05.027. Epub 2009 Jun 8.
- 151 Tanoue T, Nishida E. Molecular recognitions in the MAP kinase cascades. *Cell Signal*. 2003 May;15(5):455-62.
- 152 Nishio Y, Dong Y, Paris M, O'Keefe RJ, Schwarz EM, Drissi H. Runx2-mediated regulation of the zinc finger Osterix/Sp7 gene. *Gene*. 2006 May 10;372:62-70. Epub 2006 Mar 29.
- 153 Hankenson KD, Gagne K, Shaughnessy M. Extracellular signaling molecules to promote fracture healing and bone regeneration. *Adv Drug Deliv Rev*. 2015 Nov 1;94:3-12.
- 154 Chen D, Zhao M, Mundy GR. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors*. 2004 Dec;22(4):233-41.
- 155 Nakase T, Yoshikawa H. Potential roles of bone morphogenetic proteins (BMPs) in skeletal repair and regeneration. *J Bone Miner Metab*. 2006;24(6):425-33.
- 156 Reddi AH, Cunningham NS. Initiation and promotion of bone differentiation by bone morphogenetic proteins. *J Bone Miner Res*. 1993 Dec;8 Suppl 2:S499-502.
- 157 Sánchez-Duffhues G, Hiepen C, Knaus P, Ten Dijke P. Bone morphogenetic protein signaling in bone homeostasis. *Bone*. 2015 Nov;80:43-59.
- 158 Rosier RN, O'Keefe RJ, Hicks DG. The potential role of transforming growth factor beta in fracture healing. *Clin Orthop Relat Res*. 1998 Oct;(355 Suppl):S294-300.
- 159 Ryoo HM, Lee MH, Kim YJ. Critical molecular switches involved in BMP-2-induced osteogenic differentiation of mesenchymal cells. *Gene*. 2006 Jan 17;366(1):51-7.
- 160 Quinn JM, Itoh K, Udagawa N, Hausler K, Yasuda H, Shima N, Mizuno A, Higashio K, Takahashi N, Suda T, Martin TJ, Gillespie MT. Transforming growth factor beta affects osteoclast differentiation via direct and indirect actions. *J Bone Miner Res*. 2001 Oct;16(10):1787-94.

- 161 Xiao G, Jiang D, Gopalakrishnan R, Franceschi RT. Fibroblast growth factor 2 induction of the osteocalcin gene requires MAPK activity and phosphorylation of the osteoblast transcription factor, Cbfa1/Runx2. *J Biol Chem*. 2002 Sep 27;277(39):36181-7.
- 162 Kotev-Emeth S, Savion N, Pri-chen S, Pitaru S. Effect of maturation on the osteogenic response of cultured stromal bone marrow cells to basic fibroblast growth factor. *Bone*. 2000 Dec;27(6):777-83.
- 163 Marie PJ. Fibroblast growth factor signaling controlling bone formation: an update. *Gene*. 2012 Apr 25;498(1):1-4.
- 164 Ambrosetti D, Holmes G, Mansukhani A, Basilico C. Fibroblast growth factor signaling uses multiple mechanisms to inhibit Wnt-induced transcription in osteoblasts. *Mol Cell Biol*. 2008 Aug;28(15):4759-71.
- 165 Kawaguchi H, Chikazu D, Nakamura K, Kumegawa M, Hakeda Y. Direct and indirect actions of fibroblast growth factor 2 on osteoclastic bone resorption in cultures. Abstract. *J Bone Miner Res*. 2000 Mar;15(3):466-73.
- 166 Hollinger JO, Hart CE, Hirsch SN, Lynch S, Friedlaender GE. Recombinant human platelet-derived growth factor: biology and clinical applications. *J Bone Joint Surg Am*. 2008 Feb;90 Suppl 1:48-54.
- 167 Dai J, Rabie AB. VEGF: an essential mediator of both angiogenesis and endochondral ossification. *J Dent Res*. 2007 Oct;86(10):937-50.
- 168 Evans CH, Huard J. Gene therapy approaches to regenerating the musculoskeletal system. *Nat Rev Rheumatol*. 2015 Apr;11(4):234-42.
- 169 Yao S, Liu D, Pan F, Wise GE. Effect of vascular endothelial growth factor on RANK gene expression in osteoclast precursors and on osteoclastogenesis. *Arch Oral Biol*. 2006 Jul;51(7):596-602.
- 170 Middleton J, Arnott N, Walsh S, Beresford J. Osteoblasts and osteoclasts in adult human osteophyte tissue express the mRNAs for insulin-like growth factors I and II and the type 1 IGF receptor. *Bone*. 1995 Mar;16(3):287-93.
- 171 Crane JL, Cao X. Function of matrix IGF-1 in coupling bone resorption and formation. *J Mol Med (Berl)*. 2014 Feb;92(2):107-15.
- 172 Clemens TL, Chernausk SD. Genetic strategies for elucidating insulin-like growth factor action in bone. *Growth Horm IGF Res*. 2004 Jun;14(3):195-9.
- 173 Niu T, Rosen CJ. The insulin-like growth factor-I gene and osteoporosis: a critical appraisal. *Gene*. 2005 Nov 21;361:38-56.
- 174 Simon MC, Keith B. The role of oxygen availability in embryonic development and stem cell function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008 Apr;9(4):285-96.

- 175 Yoshida Y, Takahashi K, Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Hypoxia enhances the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 2009 Sep 4;5(3)
- 176 Fotia C, Massa A, Boriani F, Baldini N, Granchi D. Prolonged exposure to hypoxic milieu improves the osteogenic potential of adipose derived stem cells. *J Cell Biochem*. 2015 Jul;116(7):1442-53.
- 177 Jones DL, Wagers AJ. No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008 Jan;9(1):11-21.
- 178 Voog J, Jones DL. Stem cells and the niche: a dynamic duo. *Cell Stem Cell*. 2010 Feb 5;6(2):103-15.
- 179 Scadden DT. The stem-cell niche as an entity of action. *Nature*. 2006 Jun 29;441(7097):1075-9.
- 180 Eliasson P, Jönsson JI. The hematopoietic stem cell niche: low in oxygen but a nice place to be. *J Cell Physiol*. 2010 Jan;222(1):17-22.
- 181 Wagenführ L, Meyer AK, Marrone L, Storch A. Oxygen Tension Within the Neurogenic Niche Regulates Dopaminergic Neurogenesis in the Developing Midbrain. *Stem Cells Dev*. 2016 Feb 1;25(3):227-38.
- 182 Silván U, Díez-Torre A, Arluzea J, Andrade R, Silió M, Aréchaga J. Hypoxia and pluripotency in embryonic and embryonal carcinoma stem cell biology. *Differentiation*. 2009 Sep-Oct;78(2-3):159-68.
- 183 Brahim-Horn MC, Pouyssegur J. Oxygen, a source of life and stress. *FEBS Lett*. 2007 Jul 31;581(19):3582-91.
- 184 Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 and cancer pathogenesis. *IUBMB Life*. 2008 Sep;60(9):591-7
- 185 Harrison JS, Rameshwar P, Chang V, Bandari P. Oxygen saturation in the bone marrow of healthy volunteers. *Blood*. 2002 Jan 1;99(1):394.
- 186 Kofoed H, Sjøntoft E, Siemssen SO, Olesen HP. Bone marrow circulation after osteotomy. Blood flow, pO<sub>2</sub>, pCO<sub>2</sub>, and pressure studied in dogs. *Acta Orthop Scand*. 1985 Oct;56(5):400-3.
- 187 Matsumoto A, Matsumoto S, Sowers AL, Koscielniak JW, Trigg NJ, Kuppusamy P, Mitchell JB, Subramanian S, Krishna MC, Matsumoto K. Absolute oxygen tension (pO<sub>2</sub>) in murine fatty and muscle tissue as determined by EPR. *Magn Reson Med*. 2005 Dec;54(6):1530-5.

- 188 Pasarica M, Rood J, Ravussin E, Schwarz JM, Smith SR, Redman LM. Reduced oxygenation in human obese adipose tissue is associated with impaired insulin suppression of lipolysis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010 Aug;95(8):4052-5.
- 189 D'Ippolito G, Diabira S, Howard GA, Roos BA, Schiller PC. Low oxygen tension inhibits osteogenic differentiation and enhances stemness of human MIAMI cells. *Bone.* 2006 Sep;39(3):513-22.
- 190 Fehrer C, Brunauer R, Laschober G, Unterluggauer H, Reitinger S, Kloss F, Güllly C, Gassner R, Lepperdinger G. Reduced oxygen tension attenuates differentiation capacity of human mesenchymal stem cells and prolongs their lifespan. *Aging Cell.* 2007 Dec;6(6):745-57.
- 191 Holzwarth C, Vaegler M, Gieseke F, Pfister SM, Handgretinger R, Kerst G, Müller I. Low physiologic oxygen tensions reduce proliferation and differentiation of human multipotent mesenchymal stromal cells. *BMC Cell Biol.* 2010 Jan 28;11:11.
- 192 Adesida AB, Mulet-Sierra A, Jomha NM. Hypoxia mediated isolation and expansion enhances the chondrogenic capacity of bone marrow mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Res Ther.* 2012 Mar 2;3(2):9.
- 193 Markway BD, Tan GK, Brooke G, Hudson JE, Cooper-White JJ, Doran MR. Enhanced chondrogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in low oxygen environment micropellet cultures. *Cell Transplant.* 2010;19(1):29-42.
- 194 Tsai CC, Chen YJ, Yew TL, Chen LL, Wang JY, Chiu CH, Hung SC. Hypoxia inhibits senescence and maintains mesenchymal stem cell properties through down-regulation of E2A-p21 by HIF-TWIST. *Blood.* 2011 Jan 13;117(2):459-69.
- 195 Chung HM, Won CH, Sung JH. Responses of adipose-derived stem cells during hypoxia: enhanced skin-regenerative potential. *Expert Opin Biol Ther.* 2009 Dec;9(12):1499-508.
- 196 Malladi P, Xu Y, Chiou M, Giaccia AJ, Longaker MT. Effect of reduced oxygen tension on chondrogenesis and osteogenesis in adipose-derived mesenchymal cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2006 Apr;290(4):C1139-46.
- 197 Lee JH, Kemp DM. Human adipose-derived stem cells display myogenic potential and perturbed function in hypoxic conditions. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006 Mar 17;341(3):882-8.
- 198 Wang DW, Fermor B, Gimble JM, Awad HA, Guilak F. Influence of oxygen on the proliferation and metabolism of adipose derived adult stem cells. *J Cell Physiol.* 2005 Jul;204(1):184-91.
- 199 Valorani MG, Montelatici E, Germani A, Biddle A, D'Alessandro D, Strollo R, Patrizi MP, Lazzari L, Nye E, Otto WR, Pozzilli P, Alison MR. Pre-culturing human adipose tissue

mesenchymal stem cells under hypoxia increases their adipogenic and osteogenic differentiation potentials. *Cell Prolif.* 2012 Jun;45(3):225-38.

200 Hamm LL, Nakhoul N, Hering-Smith KS. Acid-Base Homeostasis. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2015 Dec 7;10(12):2232-42.

201 Gerweck LE, Seetharaman K. Cellular pH gradient in tumor versus normal tissue: potential exploitation for the treatment of cancer. *Cancer Res.* 1996 Mar 15;56(6):1194-8.

202 Kraut JA, Madias NE. Metabolic acidosis: pathophysiology, diagnosis and management. *Nat Rev Nephrol.* 2010 May;6(5):274-85.

203 Schoolwerth AC, Kaneko TM, Sedlacek M, Block CA, Remillard BD. Acid-base disturbances in the intensive care unit: metabolic acidosis. *Semin Dial.* 2006 Nov-Dec;19(6):492-5.

204 Dong GR, Jain RK. Noninvasive measurement of interstitial pH profiles in normal and neoplastic tissue using fluorescence ratio imaging microscopy. *Cancer Res.* 1994 Nov 1;54(21):5670-4.

205 Dong L, Li Z, Leffler NR, Asch AS, Chi JT, Yang LV. Acidosis activation of the proton-sensing GPR4 receptor stimulates vascular endothelial cell inflammatory responses revealed by transcriptome analysis. *PLoS One.* 2013 Apr 16;8(4):e61991.

206 Engin K, Leeper DB, Cater JR, Thistlethwaite AJ, Tupchong L, McFarlane JD. Extracellular pH distribution in human tumours. *Int J Hyperthermia.* 1995 Mar-Apr;11(2):211-6.

207 Newman RJ, Stone MH, Mukherjee SK. Accelerated fracture union in association with severe head injury. *Injury.* 1987 Jul;18(4):241-6.

208 Newman RJ, Duthie RB, Francis MJ. Nuclear magnetic resonance studies of fracture repair. *Clin Orthop Relat Res.* 1985 Sep;(198):297-303.

209 Chakkalakal DA, Mashoof AA, Novak J, Strates BS, McGuire MH. Mineralization and pH relationships in healing skeletal defects grafted with demineralized bone matrix. *J Biomed Mater Res.* 1994 Dec;28(12):1439-43.

210 Arnett TR. Acidosis, hypoxia and bone. *Arch Biochem Biophys.* 2010 Nov 1;503(1):103-9.

211 Rosset P, Deschaseaux F, Layrolle P. Cell therapy for bone repair. *Orthop Traumatol Surg Res.* 2014 Feb;100(1 Suppl):S107-12.

212 Gómez-Barrena E, Rosset P, Lozano D, Stanovici J, Ermthaller C, Gerbhard F. Bone fracture healing: cell therapy in delayed unions and nonunions. *Bone fracture healing: cell therapy in delayed unions and nonunions.*

- 213 Beauséjour C. Bone marrow-derived cells: the influence of aging and cellular senescence. *Handb Exp Pharmacol*. 2007;(180):67-88.
- 214 Shimizu T, Ishikawa T, Sugihara E, Kuninaka S, Miyamoto T, Mabuchi Y, Matsuzaki Y, Tsunoda T, Miya F, Morioka H, Nakayama R, Kobayashi E, Toyama Y, Kawai A, Ichikawa H, Hasegawa T, Okada S, Ito T, Ikeda Y, Suda T, Saya H. c-MYC overexpression with loss of Ink4a/Arf transforms bone marrow stromal cells into osteosarcoma accompanied by loss of adipogenesis. *Oncogene*. 2010 Oct 21;29(42):5687-99.
- 215 Xu X, Zhang X, Wang S, Qian H, Zhu W, Cao H, Wang M, Chen Y, Xu W. Isolation and comparison of mesenchymal stem-like cells from human gastric cancer and adjacent non-cancerous tissues. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2011 Mar;137(3):495-504.
- 216 Lin TM, Chang HW, Wang KH, Kao AP, Chang CC, Wen CH, Lai CS, Lin SD. Isolation and identification of mesenchymal stem cells from human lipoma tissue. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 Oct 5;361(4):883-9.
- 217 Spaeth EL, Labaff AM, Toole BP, Klopp A, Andreeff M, Marini FC. Mesenchymal CD44 expression contributes to the acquisition of an activated fibroblast phenotype via TWIST activation in the tumor microenvironment. *Cancer Res*. 2013 Sep 1;73(17):5347-59.
- 218 Levi B, Longaker MT. Concise review: adipose-derived stromal cells for skeletal regenerative medicine. *Stem Cells*. 2011 Apr;29(4):576-82.
- 219 Kim EH, Heo CY. Current applications of adipose-derived stem cells and their future perspectives. *World J Stem Cells*. 2014 Jan 26;6(1):65-8.
- 220 Haque N, Rahman MT, Abu Kasim NH, Alabsi AM. Hypoxic culture conditions as a solution for mesenchymal stem cell based regenerative therapy. *ScientificWorldJournal*. 2013 Aug 27;2013:632972.
- 221 Fotia C, Massa A, Boriani F, Baldini N, Granchi D. Hypoxia enhances proliferation and stemness of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Cytotechnology*. 2015 Dec;67(6):1073-84.
- 222 Riekstina U, Cakstina I, Parfejevs V, Hoogduijn M, Jankovskis G, Muiznieks I, Muceniece R, Ancans J. Embryonic stem cell marker expression pattern in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, heart and dermis. *Stem Cell Rev*. 2009 Dec;5(4):378-86.
- 223 Granchi D, Ochoa G, Leonardi E, Devescovi V, Baglìo SR, Osaba L, Baldini N, Ciapetti G. Gene expression patterns related to osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells during ex vivo expansion. *Tissue Eng Part C Methods*. 2010 Jun;16(3):511-24.
- 224 Beertsen W, van den Bos T. Alkaline phosphatase induces the mineralization of sheets of collagen implanted subcutaneously in the rat. *J Clin Invest*. 1992 Jun;89(6):1974-80.



- 225 Bourin P, Bunnell BA, Casteilla L, Dominici M, Katz AJ, March KL, Redl H, Rubin JP, Yoshimura K, Gimble JM. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy*. 2013 Jun;15(6):641-8.
- 226 Granero-Moltó F, Weis JA, Miga MI, Landis B, Myers TJ, O'Rear L, Longobardi L, Jansen ED, Mortlock DP, Spagnoli A. Regenerative effects of transplanted mesenchymal stem cells in fracture healing. *Stem Cells*. 2009 Aug;27(8):1887-98.
- 227 Li Q, Zhang A, Tao C, Li X, Jin P. The role of SDF-1-CXCR4/CXCR7 axis in biological behaviors of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 Nov 22;441(3):675-80.
- 228 Suga H, Matsumoto D, Eto H, Inoue K, Aoi N, Kato H, Araki J, Yoshimura K. Functional implications of CD34 expression in human adipose-derived stem/progenitor cells. *Stem Cells Dev*. 2009 Oct;18(8):1201-10.
- 229 Lieberman JR, Daluiski A, Einhorn TA. The role of growth factors in the repair of bone. Biology and clinical applications. *J Bone Joint Surg Am*. 2002 Jun;84-A(6):1032-44.
- 230 Fekete N, Rojewski MT, Lotfi R, Schrezenmeier H. Essential components for ex vivo proliferation of mesenchymal stromal cells. *Tissue Eng Part C Methods*. 2014 Feb;20(2):129-39.
- 231 Gharibi B, Hughes FJ. Effects of medium supplements on proliferation, differentiation potential, and in vitro expansion of mesenchymal stem cells. *Stem Cells Transl Med*. 2012 Nov;1(11):771-82.
- 232 Roemeling-van Rhijn M, Mensah FK, Korevaar SS, Leijns MJ, van Osch GJ, Ijzermans JN, Betjes MG, Baan CC, Weimar W, Hoogduijn MJ. Effects of Hypoxia on the Immunomodulatory Properties of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem cells. *Front Immunol*. 2013 Jul 18;4:203.
- 233 Alliston T, Choy L, Ducy P, Karsenty G, Derynck R. TGF-beta-induced repression of CBFA1 by Smad3 decreases cbfa1 and osteocalcin expression and inhibits osteoblast differentiation. *EMBO J*. 2001 May 1;20(9):2254-72.
- 234 Wan C, Gilbert SR, Wang Y, Cao X, Shen X, Ramaswamy G, Jacobsen KA, Alaql ZS, Eberhardt AW, Gerstenfeld LC, Einhorn TA, Deng L, Clemens TL. Activation of the hypoxia-inducible factor-1alpha pathway accelerates bone regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Jan 15;105(2):686-91.
- 235 Wagegg M, Gaber T, Lohanatha FL, Hahne M, Strehl C, Fangradt M, Tran CL, Schönbeck K, Hoff P, Ode A, Perka C, Duda GN, Buttgereit F. Hypoxia promotes osteogenesis but suppresses adipogenesis of human mesenchymal stromal cells in a hypoxia-inducible factor-1 dependent manner. *PLoS One*. 2012;7(9):e46483.

- 236 Sahai S, Williams A, Skiles ML, Blanchette JO. Osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells is hypoxia-inducible factor-1 independent. *Tissue Eng Part A*. 2013 Jul;19(13-14):1583-91.
- 237 Ding H, Gao YS, Hu C, Wang Y, Wang CG, Yin JM, Sun Y, Zhang CQ. HIF-1 $\alpha$  transgenic bone marrow cells can promote tissue repair in cases of corticosteroid-induced osteonecrosis of the femoral head in rabbits. *PLoS One*. 2013 May 13;8(5):e63628.
- 238 Ding H, Gao YS, Wang Y, Hu C, Sun Y, Zhang C. Dimethylxaloylglycine increases the bone healing capacity of adipose-derived stem cells by promoting osteogenic differentiation and angiogenic potential. *Stem Cells Dev*. 2014 May 1;23(9):990-1000.
- 239 Rosová I, Dao M, Capoccia B, Link D, Nolte JA. Hypoxic preconditioning results in increased motility and improved therapeutic potential of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2008 Aug;26(8):2173-82.
- 240 Volkmer E, Kallukalam BC, Maertz J, Otto S, Drosse I, Polzer H, Bocker W, Stengele M, Docheva D, Mutschler W, Schieker M. Hypoxic preconditioning of human mesenchymal stem cells overcomes hypoxia-induced inhibition of osteogenic differentiation. *Tissue Eng Part A*. 2010 Jan;16(1):153-64.
- 241 Sheehy EJ, Buckley CT, Kelly DJ. Oxygen tension regulates the osteogenic, chondrogenic and endochondral phenotype of bone marrow derived mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 Jan 6;417(1):305-10.
- 242 Kim S, Chaudhry A, Lee I, Frank JA. Effects of long-term hypoxia and pro-survival cocktail in bone marrow-derived stromal cell survival. *Stem Cells Dev*. 2014 Mar 1;23(5):530-40.
- 243 Lee JH, Kemp DM. Human adipose-derived stem cells display myogenic potential and perturbed function in hypoxic conditions. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 Mar 17;341(3):882-8.
- 244 Merceron C, Vinatier C, Portron S, Masson M, Amiaud J, Guigand L, Chérel Y, Weiss P, Guicheux J. Differential effects of hypoxia on osteochondrogenic potential of human adipose-derived stem cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2010 Feb;298(2):C355-64.
- 245 Choi JR, Pinguan-Murphy B, Wan Abas WA, Noor Azmi MA, Omar SZ, Chua KH, Wan Safwani WK. Impact of low oxygen tension on stemness, proliferation and differentiation potential of human adipose-derived stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014 May 30;448(2):218-24.
- 246 Russo V, Yu C, Belliveau P, Hamilton A, Flynn LE. Comparison of human adipose-derived stem cells isolated from subcutaneous, omental, and intrathoracic adipose tissue depots for regenerative applications. *Stem Cells Transl Med*. 2014 Feb;3(2):206-17.
- 247 Schäck LM, Noack S, Winkler R, Wißmann G, Behrens P, Wellmann M, Jagodzinski M, Krettek C, Hoffmann A. The Phosphate Source Influences Gene Expression and Quality of

Mineralization during In Vitro Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *PLoS One*. 2013 Jun 18;8(6):e65943.

248 Disthabanchong S, Radinahamed P, Stitchantrakul W, Hongeng S, Rajatanavin R.. Chronic metabolic acidosis alters osteoblast differentiation from human mesenchymal stem cells. *Kidney Int*. 2007 Feb;71: 201-9.

249 Hjelmeland AB, Wu Q, Heddleston JM, Choudhary GS, MacSwords J, Lathia JD, McLendon R, Lindner D, Sloan A, Rich JN. Acidic stress promotes a glioma stem cell phenotype. *Cell Death Differ*. 2011 May;18(5):829-40.

250 Obokata H, Wakayama T, Sasai Y, Kojima K, Vacanti MP, Niwa H, Yamato M, Vacanti CA. Stimulus-triggered fate conversion of somatic cells into pluripotency. *Nature*. 2014 Jan 30;505(7485):641-7.

251 Martin GR, Jain RK. Noninvasive measurement of interstitial pH profiles in normal and neoplastic tissue using fluorescence ratio imaging microscopy. *Cancer Res*. 1994 Nov 1;54(21):5670-4.

252 Urban JP. The role of the physicochemical environment in determining disc cell behaviour. *Biochem Soc Trans*. 2002 Nov;30(Pt 6):858-64.

253 Animireddy D, Reddy Bekkem VT, Vallala P, Kotha SB, Ankireddy S, Mohammad N. Evaluation of pH, buffering capacity, viscosity and flow rate levels of saliva in caries-free, minimal caries and nursing caries children: An in vivo study. *Contemp Clin Dent*. 2014 Jul;5(3):324-8.

254 Graziano A, d'Aquino R, Laino G, Papaccio G. Dental pulp stem cells: a promising tool for bone regeneration. *Stem Cell Rev*. 2008 Spring;4(1):21-6.

255 Disthabanchong, Radinahamed P, Stitchantrakul W, Hongeng S, Rajatanavin R.. Chronic metabolic acidosis alters osteoblast differentiation from human mesenchymal stem cells. *Kidney Int*. 2007 Feb;71: 201-9

256 Rodgers JT, King KY, Brett JO, Cromie MJ, Charville GW, Maguire KK, Brunson C, Mastey N, Liu L, Tsai CR, Goodell MA, Rando TA. mTORC1 controls the adaptive transition of quiescent stem cells from G0 to G(Alert). *Nature*. 2014 Jun 19;510(7505):393-6.

257 Dimmeler S, Ding S, Rando TA, Trounson A. Translational strategies and challenges in regenerative medicine. *Nat Med*. 2014 Aug;20(8):814-21.

258 Akatov VS, Lezhnev EI, Vexler AM, Kublik LN. Low pH value of pericellular medium as a factor limiting cell proliferation in dense cultures. *Exp Cell Res*. 1985 Oct;160(2):412-8.

259 McAdams TA, Miller WM, Papoutsakis ET. Variations in culture pH affect the cloning efficiency and differentiation of progenitor cells in ex vivo haemopoiesis. *Br J Haematol*. 1997 Jun;97(4):889-95. 1

- 260 Lardner A. The effects of extracellular pH on immune function. *J Leukoc Biol.* 2001 Apr;69(4):522-30. 1
- 261 Fukumura D, Xu L, Chen Y, Gohongi T, Seed B, Jain RK. Hypoxia and acidosis independently up-regulate vascular endothelial growth factor transcription in brain tumors in vivo. *Cancer Res.* 2001 Aug 15;61(16):6020-4.
- 262 Al-Husari M, Webb SD. Acid-mediated tumour cell invasion: a discrete modelling approach using the extended Potts model. *Clin Exp Metastasis.* 2013 Aug;30(6):793-806.
- 263 Taylor S, Spugnini EP, Assaraf YG, Azzarito T, Rauch C, Fais S. Microenvironment acidity as a major determinant of tumor chemoresistance: Proton pump inhibitors (PPIs) as a novel therapeutic approach. *Drug Resist Updat.* 2015 Nov;23:69-78.
- 264 Cesarz Z, Tamama K. Spheroid Culture of Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Int.* 2016;2016:9176357.
- 265 Li Y, Guo G, Li L, Chen F, Bao J, Shi YJ, Bu H. Three-dimensional spheroid culture of human umbilical cord mesenchymal stem cells promotes cell yield and stemness maintenance. *Cell Tissue Res.* 2015 May;360(2):297-307.
- 266 Beltrami AP, Cesselli D, Beltrami CA. Pluripotency rush! Molecular cues for pluripotency, genetic reprogramming of adult stem cells, and widely multipotent adult cells. *Pharmacol Ther.* 2009 Oct;124(1):23-30.
- 267 Beltrami AP, Cesselli D, Beltrami CA. Pluripotency rush! Molecular cues for pluripotency, genetic reprogramming of adult stem cells, and widely multipotent adult cells. *Pharmacol Ther.* 2009 Oct;124(1):23-30.
- 268 Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell.* 2007 Nov 30;131(5):861-72.
- 269 Kim BC, Bae H, Kwon IK, Lee EJ, Park JH, Khademhosseini A, Hwang YS. Osteoblastic/cementoblastic and neural differentiation of dental stem cells and their applications to tissue engineering and regenerative medicine. *Tissue Eng Part B Rev.* 2012 Jun;18(3):235-44.
- 270 Gervois P, Struys T, Hilkens P, Bronckaers A, Ratajczak J, Politis C, Brône B, Lambrichts I, Martens W. Neurogenic maturation of human dental pulp stem cells following neurosphere generation induces morphological and electrophysiological characteristics of functional neurons. *Stem Cells Dev.* 2015 Feb 1;24(3):296-311.
- 271 Foudah D, Monfrini M, Donzelli E, Niada S, Brini AT, Orciani M, Tredici G, Miloso M. Expression of neural markers by undifferentiated mesenchymal-like stem cells from different sources. *J Immunol Res.* 2014;2014:987678.

- 272 Martens W, Wolfs E, Struys T, Politis C, Bronckaers A, Lambrichts I. Expression pattern of basal markers in human dental pulp stem cells and tissue. *Cells Tissues Organs*. 2012;196(6):490-500.
- 273 Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*. 2000 Mar;182(3):311-22.
- 274 Cheung TH, Rando TA. Molecular regulation of stem cell quiescence. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2013 Jun;14(6):329-40.
- 275 Frick KK, Jiang L, Bushinsky DA. Acute metabolic acidosis inhibits the induction of osteoblastic *egr-1* and type 1 collagen. *Am J Physiol*. 1997 May;272(5 Pt 1):C1450-6.
- 276 Kohn DH, Sarmadi M, Helman JI, Krebsbach PH. Effects of pH on human bone marrow stromal cells in vitro: implications for tissue engineering of bone. *J Biomed Mater Res*. 2002 May;60(2):292-9.
- 277 Holtz KM, Kantrowitz ER. The mechanism of the alkaline phosphatase reaction: insights from NMR, crystallography and site-specific mutagenesis. *FEBS Lett*. 1999 Nov 26;462(1-2):7-11.
- 278 Frick KK, Bushinsky DA. Chronic metabolic acidosis reversibly inhibits extracellular matrix gene expression in mouse osteoblasts. *Am J Physiol*. 1998 Nov;275(5 Pt 2):F840-7.